

ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN  
DEPARTEMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT  
INSTITUT FÜR UMWELT UND NATÜRLICHE RESSOURCEN

**Entwicklung eines Konzeptes zur biologischen Bekämpfung des invasiven  
Japankäfers, *Popillia japonica***



Masterarbeit

**von  
Hofer Sheila**

Masterstudiengang Umwelt und natürliche Ressourcen

Abgabedatum 22.07.2020

Studienrichtung Agrofoodsystems

Fachkorrektoren:

Prof. Dr. Grunder, Jürg

ZHAW Life Sciences und Facility Management, Grüental, 8820 Wädenswil

Dr. Fischer, Esther

ZHAW Life Sciences und Facility Management, Grüental, 8820 Wädenswil

## Impressum

Keywords: *Popillia japonica*, Japankäfer, Nematoden, biologische Bekämpfungsstrategie

Zitiervorschlag: Hofer, S. (2020). Entwicklung eines Konzeptes zur biologischen Bekämpfung des invasiven Japankäfers, *Popillia japonica* (Masterarbeit, Umwelt und natürliche Ressourcen). Zürich: ZHAW, Departement Life Science and Facility Management.

Name des Instituts: Institut für Umwelt und natürliche Ressourcen

## Zusammenfassung

Der Japankäfer, *Popillia japonica* Newman, ist ein invasiver Schädling, welcher vor allem in den USA, wo er sich erfolgreich seit 1916 verbreitet, grosse Schäden in seinen über 300 Wirtspflanzen im Zierpflanzenbau, in der Land- und Forstwirtschaft verursacht. Im Jahr 2014 wurde *P. japonica* erstmals auf europäischem Festland, in Italien, festgestellt. Das erste lebende Exemplar wurde nun auch im Jahr 2019 in der Schweiz gefunden.

Das Schweizerische Bundesamt für Landwirtschaft ist interessiert an einer biologischen Bekämpfungsstrategie gegen *P. japonica* in der Schweiz. Aus diesem Grund wurde der ZHAW Wädenswil ein Forschungsprojekt zur Entwicklung einer Bekämpfungsstrategie gegen *P. japonica* Larven auf Basis von entomopathogenen Nematoden zugesprochen. Diese Masterarbeit sollte als Unterstützung im Forschungsprojekt dienen.

Zur Sammlung Schweizerischer entomopathogenen Nematoden wurden insgesamt 25 Standorte beprobt, welche mit einer GIS-Karte visualisiert wurden. Aus den Bodenproben wurden mittels *in vivo* Extraktionen mit dem Köderwirt *Galleria mellonella* 153 nematodenähnliche Organismen extrahiert. Die DNA der Organismen wurde aufgereinigt, durch PCR vervielfältigt und sequenziert, um die Proben einer Nematodenart zuordnen zu können. Insgesamt konnten aus 224 Proben (direkt isolierte und Reinfektionen), 106 Proben entomopathogene Nematoden zugeordnet werden. Total sieben verschiedene entomopathogene Nematodenarten wurden identifiziert.

Für die Messung der Mortalität der gesammelten Nematoden gegen *P. japonica* Larven, wurde ein zweistufiger Biotests entwickelt und getestet. Statt *P. japonica* Larven wurden *Cetoniinae* Larven verwendet. Erst wurde die Mortalität der Larven mit zufällig gewählten Nematoden gemessen, welche direkt auf die Kutikula aufgetragen wurden. Anschliessend wurde die Mortalität mittels eines Topfversuchs über das Substrat erhoben. In den Testversuchen zeigte *Steinernema felitiae* aus dem Kanton Uri eine 60% Mortalität gegen *Cetoniinae* Larven.

Die Biotests können zukünftig mit einigen Verbesserungen, wie die Anhebung der Anzahl Wiederholungen zu statistischen Zwecken, für die Analyse der Mortalität von *P. japonica* Larven unter Quarantänebedingungen angewendet werden.

Bis zum verkaufsfertigen Produkt auf Basis von Nematoden, sind jedoch noch einige Versuche durchzuführen. Diese reichen von der Optimierung der Applikationsparameter, bis hin zu Feldversuchen.

Die Verbreitung von *P. japonica* in der Schweiz, ist in den kommenden Jahren absehbar. Deshalb ist die baldige Entwicklung einer Bekämpfungsstrategie besonders wichtig.

---

## Abstract

The Japanese beetle, *Popillia japonica* Newman, is an invasive pest that causes great damage to its more than 300 host plants in ornamental horticulture, agriculture and forestry, especially in the USA, where it has been spreading successfully since 1916. In 2014, *P. japonica* was first detected in Italy. The first living Japanese beetle has now also been found in Switzerland in 2019.

The Swiss Federal Office for Agriculture is interested in a biological control strategy to control *P. japonica* in Switzerland. For this reason, ZHAW Wädenswil got a research project to develop a control strategy against *P. japonica* larvae based on entomopathogenic nematodes. This master's thesis was intended as support for the research project.

For the collection of Swiss entomopathogenic nematodes, a total of 25 sites were sampled and visualized with a GIS map. From the soil samples 153 nematode-like organisms were extracted *in vivo* using the bait host *Galleria mellonella*. The DNA of the organisms was purified, amplified by PCR and sequenced to assign the samples to a nematode species. From a total of 224 samples (directly isolated and reinfections), 106 samples could be assigned to entomopathogenic nematodes. A total of seven entomopathogenic nematode species could be identified.

A two-step biotest was developed and tested for the measurement of the mortality of the collected nematodes against *P. japonica* larvae. Instead of *P. japonica* larvae, *Cetoniinae* larvae were used. First, the mortality of the larvae was measured with randomly selected nematodes applied directly to the cuticle, then by a pot experiment over the substrate. In the experiments, *Steinernema feltiae* from the canton of Uri showed a 60% mortality to *Cetoniinae* larvae.

The biotests can be applied in the future for the mortality-analysis of *P. japonica* larvae under quarantine conditions with some improvements, such as increasing the number of repetitions for statistical purposes.

Before the nematode-based product is ready for sale, several additional experiments need to be performed. For example, the optimization of the application parameters and field experiments.

The spread of *P. japonica* in Switzerland is foreseeable in the following years. It is therefore important to develop a control strategy soon.

---

## **Dank**

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Korrektoren Prof. Dr. Jürg Grunder und Dr. Esther Fischer für die Unterstützung während und nach meinem Schreibprozess. Die fachlichen Inputs, wie auch die Vorkorrektur, waren für diese Masterarbeit eine grosse Bereicherung.

Ebenso danke ich Ursula Löffel für ihre unermüdliche Unterstützung bei der Organisation und Durchführung der Versuche.

Abschliessend möchte ich auch dem Team von Marilena Palmisano ebenso meinen speziellen Dank aussprechen. Ihre Zurverfügungstellung der Versuchsanlage zur molekulargenetischen Identifikation der Nematoden und der fachlichen Inputs für die Auswertung der Daten waren mir eine grosse Hilfe.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Nationale und internationale Situation .....	1
1.2	Lösungsansätze mit Biocontrol.....	1
1.3	Fragestellungen .....	2
1.4	Hypothesen .....	2
1.5	Die Zielsetzung .....	3
2	Theorieteil.....	4
2.1	Erscheinung und Biologie von <i>Popillia japonica</i> .....	4
2.2	Verbreitung und Fortbewegung von <i>Popillia japonica</i> .....	6
2.3	Schadbild von <i>Popillia japonica</i> .....	8
2.4	Bekämpfungsstrategien gegen <i>Popillia japonica</i> .....	11
2.5	Entomopathogene Nematoden als Bekämpfungsmethode gegen <i>Popillia japonica</i> .....	14
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Nematoden Extraktion .....	20
3.1.1	Sammlung Bodenproben .....	20
3.1.2	Vorbereitung und Inkubation der Bodenproben .....	21
3.1.3	Ernte potenziell befallener <i>Galleria mellonella</i> Larven.....	22
3.1.4	Inkubation potenziell befallener <i>Galleria mellonella</i> Larven (White-trap-Methode) .....	22
3.1.5	Nematoden Filtern .....	23
3.1.6	Reinfektion mit <i>Galleria mellonella</i> Larven.....	24
3.2	Identifikation Nematoden .....	25
3.2.1	Vorbereitung Extraktion .....	25
3.2.2	DNA Extraktion .....	25
3.2.3	Durchführung PCR .....	26
3.2.4	Gelelektrophorese .....	27
3.2.5	Vorbereitung Sequenzierung .....	28
3.2.6	Interpretation Sequenzierungsergebnisse .....	28
3.3	Anfertigung einer GIS-Karte .....	30

---

3.4	Biotests zur Ermittlung der Mortalität von <i>Cetoniinae</i> Larven unter Einfluss von entomopathogener Nematoden.....	31
3.4.1	Biotest Stufe 1 .....	31
3.4.2	Biotest Stufe 2 .....	32
4	Resultate .....	34
4.1	Sammlung Bodenproben .....	34
4.2	Sequenzierte DNA aus extrahierten Nematoden.....	35
4.3	ArcGIS-Karte .....	39
4.4	Biotests .....	40
4.4.1	Biotest Stufe 1 .....	40
4.4.2	Biotest Stufe 2 .....	41
5	Diskussion .....	43
5.1	Nematodenextraktion .....	43
5.1.1	Sammlung Nematoden .....	43
5.1.2	Isolation Nematoden .....	43
5.2	Identifikation Nematoden .....	44
5.3	Biotests .....	45
5.3.1	Biotest Stufe 1 .....	45
5.3.2	Biotest Stufe 2 .....	47
6	Schlusswort .....	49
7	Literaturverzeichnis .....	51

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Nationale und internationale Situation

Der Japankäfer (*Popillia japonica*) wurde im Jahr 2017 erstmals über Pheromonfallen in der Schweiz nachgewiesen. Im Jahr 2019 wurde der erste Lebendfund im Kanton Tessin nahe der Grenze zu Italien getätigt (Bundesamt für Landwirtschaft, 2020b).

Das Schadensmass von *P. japonica* erstreckt sich über alle Pflanzenkulturen (Land-, Forstwirtschaft, Zier- und Wildpflanzen) (Fleming, 1972). In Nordamerika wurde der *P. japonica* das erste Mal im Jahr 1916 in New Jersey nachgewiesen (Fleming, 1976), zwischenzeitlich hat dieser sich im nordamerikanischen Kontinent erfolgreich ausgebreitet und führt zu einer jährlichen Bekämpfungs- und Schadensersatzsumme von etwa 450 Millionen US Dollar (USDA/APHIS, 2000).

Dass eine ähnliche Ausbreitung in Europa mit massiven finanziellen Folgen in den kommenden Jahren stattfinden könnte, ist nicht auszuschliessen. Deshalb hat das Schweizer Bundesamt für Landwirtschaft vorsorglich zwei Projekte im Bereich biologische Bekämpfung von *P. japonica* in der Schweiz bewilligt. Die Forschungsanstalt Agroscope (Reckenholz) sucht nach einem entomopathogenen Pilz gegen *P. japonica* und die ZHAW (Wädenswil) forscht an einer entomopathogenen Nematodenart zur Bekämpfung von *P. japonica* Larven.

Im Rahmen des Japankäferprojekts wird zwischen dem Forschungsbetrieb Agroscope und auch ausländischer Kontakte, wie dem Team von Giovanni Bosio (Phytophanthar Dienst, Piemont, Italien) kooperiert, um eine m3glichst effizienten Bekämpfungsstrategie zu entwickeln.

Diese Masterarbeit ist ein Bestandteil des ZHAW Japankäferprojekts.

## 1.2 Lösungsansätze mit Biocontrol

Vereinzelte Neonicotinoide gegen *P. japonica* wurden befristet bewilligt. Diese dürfen aber nur auf Anweisung kantonaler Pflanzenschutzdienste angewendet werden (Bundesamt für Landwirtschaft, 2020a). Das Bundesamt für Landwirtschaft hat sich mit dem Aktionsplan Pflanzenschutzmittel (Bundesrat, 2017) verpflichtet alternativen zu chemisch synthetischen Pflanzenschutzmittel zu fördern. Deshalb wurde das ZHAW-Japankäferprojekt zur Entwicklung einer Bekämpfungsstrategie gegen *P. japonica* Larven mit entomopathogenen Nematoden (Hofer, 2019) an der ZHAW bewilligt.

Die Bekämpfung anderer Engerlinge mittels entomopathogener Nematoden, wie z.B. die Nutzung von *Heterorhabditis bacteriophora* gegen den Gartenlaubkäfer (Andermatt Biogarten, kein Datum), funktioniert erfolgreich. In den U.S. Staaten werden vom Landwirtschaftsministerium der Vereinigten Staaten die Nematoden *Steinernema glaseri* und *Heterorhabditis bacteriophora*



als biologische Bekämpfung gegen *P. japonica* Larven empfohlen (United States Department of Agriculture, 2015).

Es ist deshalb auch damit zu rechnen, dass Schweizer Nematodenstämme eine erfolgreiche Mortalitätsrate gegenüber *P. japonica* Larven aufweisen können.

Weiter wurde in der Vergangenheit und wird aktuell international an entomopathogenen Pilzen (Klein & Lacey, 1999, Giroux et al., 2015, Agroscope, 2019), Bakterien (Lacey et al., 1994, Lacey et al., 1995, Klein & Lacey, 1999), Lockstoffen (Tumlinson et al., 1977, Ladd & McGocern, 1980) und weiteren Lösungsansätzen im biocontrol Segment gegen *P. japonica* gearbeitet.

### 1.3 Fragestellungen

Aufgrund der aktuellen Corona-Pandemie konnten die ursprünglichen Fragestellungen, welche für die Disposition (auf [complexis.zhaw.ch](https://complexis.zhaw.ch) einsehbar) ausgearbeitet wurden, mehrheitlich nicht beantwortet werden. Die Fragestellungen wurden deshalb neu formuliert:

- Können anhand von Bodenproben in der Schweiz verschiedene entomopathogene Nematoden extrahiert, in Zucht genommen und mittels PCR sowohl Sequenzierungen einer Nematodenart zugeordnet werden?
- Kann mit den isolierten Nematoden ein zweistufiger Biotest zur Bestimmung der Mortalität von *Cetoniinae*-Larven entwickelt und getestet werden, welcher im Projektverlauf für die Evaluation von Bekämpfungsstrategien gegen *P. japonica* Larven angewendet werden kann?
- Kann eine Geoinformationssystem-Karte angefertigt werden, wo Probestandorte und gefundene entomopathogene Nematoden grafisch dargestellt werden?

### 1.4 Hypothesen

- Es werden mittels schweizweit gesammelter Bodenproben verschiedene entomopathogene Nematodenarten extrahiert, in Zucht genommen und molekularbiologisch identifiziert.
- Ein zweistufiger Biotest zur Bestimmung der Mortalitätsrate von *Cetoniinae*-Larven durch gesammelte entomopathogene Nematoden wird entwickelt und getestet.
- Eine Geoinformationssystem-Karte stellt die Probestandorte, sowohl die gefundenen entomopathogenen Nematoden grafisch dar.

## 1.5 Die Zielsetzung

Das Ziel im Japankäferprojekt der ZHAW ist es, eine endemische Nematodenart zu finden, welche eine hohe Mortalitätsrate gegenüber *P. japonica* Larven aufweist und als potenzielles Bekämpfungsprodukt verwendet werden kann.

In dieser Masterarbeit werden folgende Ziele im Projekt abgedeckt:

- Es sollen 10-15 Standorte beprobt werden, um Nematoden aus den Bodenproben zu extrahieren.
- Die Nematoden, welche aus den Standorten extrahiert wurden, werden möglichst in Reinkultur gebracht, in Massenzucht aufgenommen und mittels PCR und Sequenzierung identifiziert.
- Es werden alle im Projekt erfolgten Beprobungen und Identifizierungen in die Auswertung aufgenommen.
- Es wird ein zweistufiger Biotest mit entomopathogenen Nematoden gegen *Cetoniinae*-Larven entwickelt, dokumentiert und mit 5-10 extrahierten Nematodenarten getestet, damit der Biotest im Projekt bei Erhalt der *P. japonica* Larven direkt angewendet werden kann.
- Es wird eine Geoinformationssystem-Karte mit allen im Projekt beprobten Standorten und allen gefundenen entomopathogenen Nematoden erstellt. Dies um die neuen Standorte im Verlauf des Projekts weiterhin mit einem geringen Zusatzaufwand einzutragen und anschliessend die Standorte besser analysieren zu können.

## 2 Theorieteil

In den folgenden Kapiteln wird in erster Linie auf *Popillia japonica* als Organismus eingegangen und dessen Bekämpfungsstrategien. Der Fokus wird dabei, aufgrund der Hauptthematik dieser Masterarbeit, auf die Bekämpfung mit Nematoden gelegt.

### 2.1 Erscheinung und Biologie von *Popillia japonica*

Der Japankäfer (*Popillia japonica* Newman) gehört zur Familie der Blatthornkäfer (Fleming, 1972).

Die **Eier** von *P. japonica* werden in einer Tiefe von etwa 10 cm gefunden (Dalthorp, Nyrop & Villani, 2000). Sie können verschiedene Grössen und Formen aufweisen. Üblicherweise sind sie etwa 1.5 mm gross, kugelförmig und durchsichtig bis cremig weiss (vergl. Abbildung 2 a)) (EMPPO, 2006). Sie schlüpfen normalerweise in der Zeitdauer zwischen 10 bis 14 Tagen (Fleming, 1976). Männchen schlüpfen üblicherweise ein paar Tage früher als Weibchen und das Geschlechter-Verhältnis liegt etwa bei 1:1 (Régnière, Rabb und Stinner, 1981).

Die aus den Eiern schlüpfenden **Larven** sind C-förmig und haben eine gelblich bis bräunliche Kopfkapsel mit Kau-Mundwerkzeugen. Sie haben je drei Beinpaare und zehn Abdominalsegmente (EMPPO, 2006). Der komplette Körper ist bedeckt mit braunen Härchen (Potter, Potter & Townsend, 2006). Auf der Unterseite haben die Larven zwei V-Förmige Haarformationen, welche zur Identifikation genutzt werden können (Sim, 1934).

*P. japonica* verfügt über 3 Larvenstadien (vergl. Abbildung 2 b)). Das erste Larvenstadium ist 3 mm lang (Isaacs & Wise, 2003) und dauert in der Regel 2-3 Wochen (Fleming, 1972). Das zweite Larvenstadium ist mit seinen ca. 30 mm ähnlich lang wie das dritte Larvenstadium (Isaacs & Wise, 2003) und dauert 3-4 Wochen (Fleming, 1972). Das zweite und dritte Larvenstadium können anhand der Kopfkapsel-Dimensionen unterschieden werden. Das zweite Larvenstadium hat eine Kopfkapsellänge von 1.2 mm und -breite von 1.9 mm. Das dritte Larvenstadium verfügt über eine Kopfkapsellänge von 2.1 mm und -breite von 3.1 mm (EMPPO, 2006). Normalerweise erreichen die Larven das 3. Larvenstadium Mitte September, in welchem sie überwintern können (Fleming, 1972). Eine Überwinterung im zweiten Larvenstadium, bei einem zweijährigen Lebenszyklus in kälteren Regionen ist ebenfalls möglich (Vittum, 1986). Für die Überwinterung bewegen sich die in der Regel fast voll ausgewachsenen Larven (Hoshikawa et al., 1988) in Bodenschichten von etwa 5-15 cm, oder in Ausnahmefällen auch bis in Tiefen von 20-25 cm (Fleming, 1972). Nach der Überwinterung ab 10°C, wandern die Larven wieder in die oberen Bodenschichten und fressen 4-8 Wochen, bevor sie sich verpuppen (Vittum, 1986). Bei weniger als -7°C tritt bei den Larven die Mortalität ein (Hoshikawa et al., 1988).

Die Eier und das erste Larvenstadium sind sehr stark temperatur-, feuchtigkeits- und v.a. austrocknungsempfindlich (Fleming, 1972, Petty, Johnson & Steinkraus, 2015), da diese sich schlecht oder gar nicht zum Schutz in tiefere Substratebenen begeben können (Villani & Nyrop, 1991).

Nach dem dritten Larvenstadium verpuppt sich *P. japonica*. Die **Puppen** sind 14 mm lang und 7 mm breit. Ihre Farbe reicht von cremefarben bis hellbraun (vergl. Abbildung 2 c)) (EMPPO, 2006). Sie bleiben 7-17 Tage verpuppt, wobei die neu entwickelten adulten Käfer, abhängig von der Substrattemperatur, noch weitere 2-14 Tage in der Erde verbleiben (Fleming, 1976, Régnière, Rabb & Stinner, 1981).

Das Erscheinungsbild der **Adulten** *P. japonica* ist oval, zwischen 8-11 mm lang und 5-7 mm breit. Ihre Färbung ist am Halsschild metallisch-grün und die Flügel sind kupferfarben bis braun (vergl. Abbildung 2 d)) (Hammond, 1994, Edwards, 1999). Der adulte Käfer ist optisch mit einem Gartenlaubkäfer vergleichbar, lässt sich jedoch anhand seiner fünf weissen Haarbüschel auf beiden Seiten des Hinterleibs und seinem metallenen-grünen Halsschild unterscheiden (Fleming, 1972).



Abbildung 2: Bilder vom kompletten Lebenszyklus von *Popillia japonica*. a) Eier; b) 3 Larvenstadien; c) Puppe; d) adulter Käfer (Shanovich et al., 2019).

Weibchen sind normalerweise länger als Männchen. Zudem haben Männchen beim vordersten Beinpaar eine spitzigere, angewinkelte Tibia und kürzere Tarsi als Weibchen (EMPPO, 2006).

Die Paarungszeit von *P. japonica* ist mehrheitlich anfangs Sommer (Fleming, 1972). Die unverpaarten Weibchen sondern zur Anlockung von Männchen das volatile Sexualpheromon (Z)-5-(1-decenyl)dihydro-2(3H)-furanone ab (Ladd, 1970, Tumlinson et al., 1977). Das Auftreten von Aggregationspheromonen konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden (Klein, 1981, Potter & Held, 2002).

Während seiner Lebensspanne von 4-6 Wochen, legt das *P. japonica* Weibchen >12-mal Eier. Es trägt durchschnittlich 20 Eier auf sich (Ishida & Leal, 2008). Insgesamt legt es in seiner Lebenszeit etwa 40-60 Eier. Die Eier werden in den oberen 7.5-10 cm (Fleming, 1972) eines feuchten Substrats (Allsopp, Klein und McCoy, 1992), mit tiefem Anteil an organischem Material (Dalthorp, Nyrop & Villani, 1999) abgelegt. Der Standort ist dabei üblicherweise sonnig und mit tiefem Gras bewachsenen (Potter et al., 1996). Es kommt auch vor, dass Eier in Landwirtschaftsflächen, wie z.B. in Sojafeldern platziert werden (Gould, 1963, Hammond, 1994, Edwards, 1999). Die Eiablage erfolgt in der Regel gebündelt (Dalthorp, Nyrop & Vilani, 1999) und in der Nähe von Wirtspflanzen (Dalthorp, Nyrop & Vilani, 2000). Nach der Eiablage widmen sich die Weibchen der Nahrungsaufnahme (Tumlinson et al., 1977, Ishida & Leal, 2008).

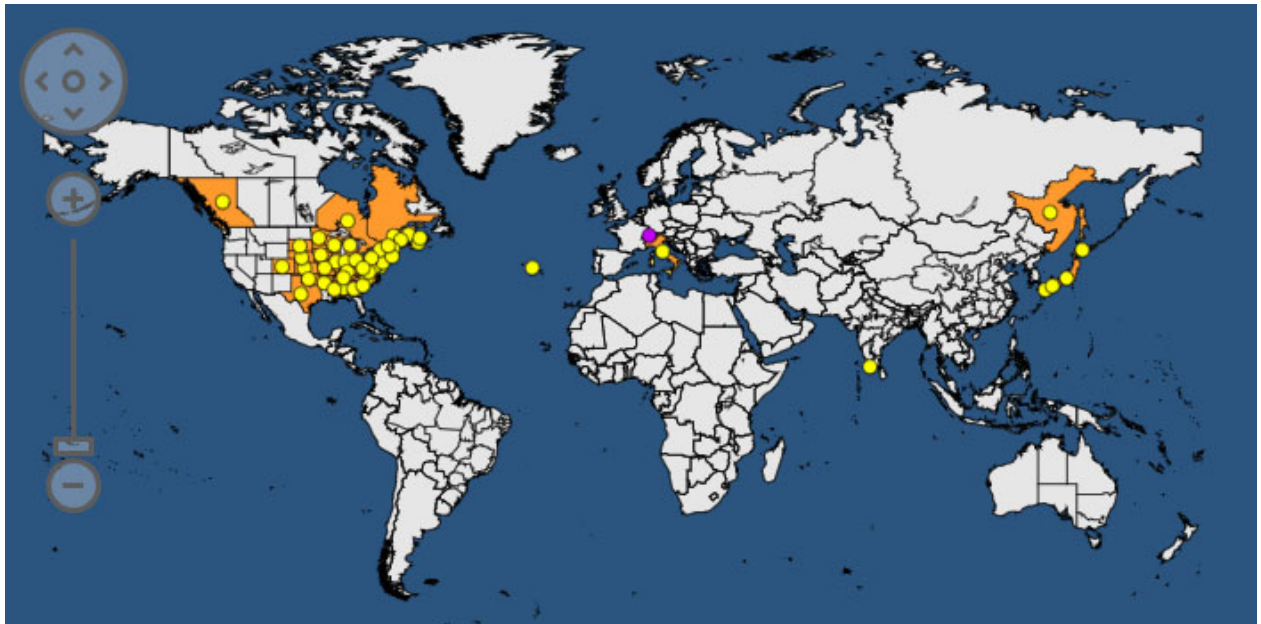
Allgemein wurde festgestellt, dass das Auftreten der Adulten und die Eiablage im Frühling je nach Temperatur und Feuchtigkeit variieren kann (Fleming, 1972). Die frühesten *P. japonica* Adulten in den USA, werden im Mai beobachtet, normalerweise treten diese jedoch erst Mitte bis Ende Juni auf (Hammond, 1994).

## **2.2 Verbreitung und Fortbewegung von *Popillia japonica***

*Popillia japonica* stammt ursprünglich aus Japan (Fleming, 1976). Dort wird die Larvenentwicklung durch für *P. japonica* suboptimale klimatische Verhältnisse und das reduzierte Vorhandensein von Grasflächen erschwert. Zudem kontrollieren natürliche Gegenspieler die *P. japonica* Population (Clausen et al., 1927).

Im Jahr 1916 wurde *P. japonica* das erste Mal in den USA (New Jersey) nachgewiesen. Seither verbreitet sich *P. japonica* dank förderlichen klimatischen Verhältnissen, einer reichhaltigen Verfügbarkeit von Wirtspflanzen und weniger natürlichen Feinde, erfolgreich (Fleming, 1976). Die Verbreitung Richtung Mittel und West-USA findet nach wie vor statt (Hudson, 2017, Severson, 2017).

Wie in der Verbreitungskarte (vergl. Abbildung 3) erkennbar, findet man *P. japonica* inzwischen ebenfalls in Portugal (Azoren), Norditalien und neuerdings auch in der Südschweiz (Bragard et al., 2019).



**Abbildung 3: Globale Verteilung von *Popillia japonica* (EPPO, 2020).**

Nach Europa kam *P. japonica* über die Azoren, wo er in den frühen 1970er Jahre aus den USA eingeschleppt wurde (Martins und Simões, 1988). Im Jahr 2014 wurde der Käfer erstmals auf dem europäischen Festland, in Norditalien nachgewiesen (Pavesi, 2014). In den vergangenen drei Jahren (2017, 2018 und 2019) wurden immer wieder Fallenfänge mit Lockstoffen in der Südschweiz getätigt (Agroscope, kein Datum). Im Jahr 2019 wurde erstmals ein Fund eines freilebenden adulten Japankäfers in der Schweiz gemacht (Bundesamt für Landwirtschaft, 2020b). Deshalb wurde *P. japonica* am 25.10.2019 vom Bundesamt für Landwirtschaft (BLW) zu einem prioritären Quarantäneorganismus in der Schweiz eingestuft. Dies hat zur Folge, dass eine Melde- und Bekämpfungspflicht herrscht (BLW, 2020).

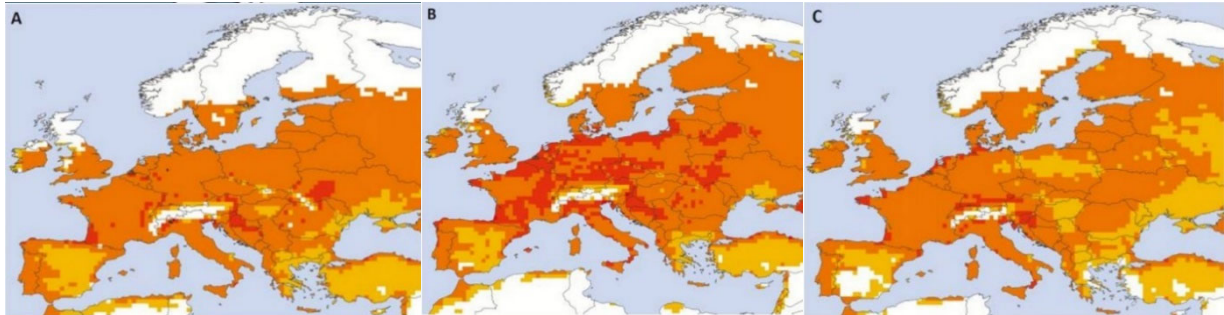
Zu der Verbreitung kommt es unter anderem dank der effizienten Mobilität adulter *P. japonica*. Sie können pro Tag 1.5, bei optimalen Bedingungen sogar 8 km zurücklegen (Fleming, 1972). Die optimalen Flugbedingungen herrschen an wolkenlosen Tagen, bei Temperaturen zwischen 29 und 35°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von über 60% und einer maximalen Windgeschwindigkeit von 20 km/h. Wind und Regen reduziert die Flugaktivität stark (Fleming, 1972, Vittum, 1986, Lacey et al., 1994). Unter 23°C hält sich *P. japonica* in der Regel auf dem Boden oder auf Pflanzen auf, ab 25°C nimmt er die Flugaktivität wieder auf (Kreuger & Potter, 2001).

Abgesehen von der selbständigen Fortbewegung von Adulten *P. japonica* spielt die menschliche Mobilität eine grosse Rolle. Über die Globalisierung wurde *P. japonica* in der Vergangenheit stark unbemerkt verbreitet (Potter & Held, 2002).

Zur Darstellung einer potenziellen weiteren Verbreitung von *P. japonica* in Europa hat Kistner-Thomas (2019) mit dem Programm CLIMEX für das Jahr 2050 Prognosekarten erstellt. Dazu hat



er als Modellierungsbasis die aktuellen Klimaverhältnisse, sowohl die beiden globalen Klimaszenarien (basierend auf der Annahme der Verdoppelung des CO<sub>2</sub> Ausstosses bis 2050) «CNRM-CM5» (stärkere Klimaempfindlichkeit) und «ACCESS1-0» (schwächere Klimaempfindlichkeit) gewählt. Diese hat er mit den *P. japonica*-angepassten Parametern Temperatur und Feuchtigkeit kombiniert. Wie die Abbildung 4 zeigt, ist unter allen Klimaszenarien eine potenzielle Verbreitung von *P. japonica* in Europa mehrheitlich möglich.



**Abbildung 4: Darstellung von drei Klimaszenarien zur potenziellen Verbreitung von *P. japonica* im Jahr 2050: A Potenzielle Verteilung von *P. japonica* unter aktuellen klimatischen Bedingungen, B unter dem globalen Klimaszenario "CNRM-CM5" und C unter dem globalen Klimaszenario "ACCESS1-0".**

Eine erfolgreiche Verbreitung von *P. japonica* in Europa, ist durch die genannten Prognosen zu befürchten. Dadurch ist zu erwarten, dass der Befall und die daraus entstehenden finanziellen Schäden ähnlich wie in den USA verlaufen können (Potter und Held, 2002).

### 2.3 Schadbild von *Popillia japonica*

*P. japonica* zählt über 300 Wirtspflanzen in mehr als 79 Pflanzenfamilien (Fleming, 1972). Nur schon in den USA wird jährlich eine Summe von etwa 450 Millionen Dollar in die Bekämpfung von *P. japonica* bzw. in Schadensersatz investiert (USDA/APHIS, 2000).

Adulte *P. japonica* orientiert sich v.a. olfaktorisch (Ahmad, 1982), aber auch anhand von Farben (Fleming, 1972). Viele volatile Pflanzenstoffe mit Blüten- oder fruchtigem Charakter, sind für *P. japonica* attraktiv (Fleming, 1969). Sie werden ebenfalls durch volatile Pflanzenstoffe angelockt, welche durch Frassschäden verursacht werden (Loughrin, Potter & Hamilton-Kemp, 1995, Loughrin et al., 1996, Loughrin et al., 1997a, Loughrin et al., 1997b).

Sobald die Adulten ihre Wirtspflanze gefunden haben, fängt ihr Blätterfrass üblicherweise am obersten Punkt der Pflanze an und wird nach unten fortgesetzt (Fleming, 1972). Das typische Frassbild adulter *P. japonica* ist ein hinterlassenes Blattskelett, da diese zwischen den Blattadern fressen (vergl. Abbildung 5) (USDA-NASS, 2018). Es kommt vor, dass *P. japonica* sich gelegentlich von Blüten und Früchten ernährt (Hölling, 2018). Zudem wurde festgestellt, dass die Frassaktivität der Käfer an verschiedenen Pflanzenarten einen lebensverkürzenden und eine Fruchtbarkeithemmende Wirkung aufweist (Ladd, 1987a, Spicer, Potter & Mcniel, 1995).



**Abbildung 5: Blattschäden durch adulte *P. japonica* (Shanovich et al., 2019). a) Nahaufnahme Blatt (Erin Hodgson); b) zerfressener Feldabschnitt (Robert Koch).**

Der aktivste Frass durch adulte *P. japonica* findet zwischen Mitte Morgen und spätem Nachmittag statt. Auch an den restlichen Tages- und Nachtzeiten kann ein verminderter Frass festgestellt werden, solange die Temperaturen über 15°C liegen (Kreuger & Potter, 2001). Die von der EPPO Global Database (kein Datum a) kommunizierten Wirtspflanzen/-arten, welche durch adulte *P. japonica* befallen werden, sind folgend aufgelistet:

- |                              |                               |                         |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| • <i>Acer</i>                | • <i>Juglans</i>              | • <i>Rubus</i>          |
| • <i>Actinidia</i>           | • <i>Malus</i>                | • <i>Salix</i>          |
| • <i>Aesculus</i>            | • <i>Medicago sativa</i>      | • <i>Solanum</i>        |
| • <i>Alnus glutinosa</i>     | • <i>Ocimum basilicum</i>     | • <i>Tilia cordata</i>  |
| • <i>Asparagus</i>           | • <i>Oenothera sp.</i>        | • <i>Trifolium</i>      |
| • <i>Betula</i>              | • <i>Parthenocissus sp.</i>   | • <i>Ulmus</i>          |
| • <i>Castanea</i>            | • <i>Phaseolus vulgaris</i>   | • <i>Urtica</i>         |
| • <i>Corylus avellana</i>    | • <i>Platanus</i>             | • <i>Vaccinium</i>      |
| • <i>Cyperaceae</i>          | • <i>Poaceae</i>              | • <i>Vitis vinifera</i> |
| • <i>Fallopia japonica</i>   | • <i>Populus</i>              | • <i>Wisteria</i>       |
| • <i>Fragaria x ananassa</i> | • <i>Prunus</i>               | • <i>Zea mays</i>       |
| • <i>Glycine max</i>         | • <i>Robinia pseudoacacia</i> |                         |
| • <i>Hibiscus</i>            | • <i>Rosa</i>                 |                         |
| • <i>Humulus lupulus</i>     |                               |                         |



Im Gegensatz zu den adulten, befallen *P. japonica* Larven mehrheitlich Gräser-, Kräuter-, Zierpflanzen- und Baumschulwurzeln (Fleming, 1972, Potter, Patterson & Redmond, 1992, Crutchfield & Potter, 1995, Smitley, 1996). Dies ist v.a. für Golf- oder Sportplatzbesitzer problematisch, da die Gräser nach dem Wurzelfrass austrocknen (vergl. Abbildung 6) (Potter, 1998, Vittum, Villani & Tashiro, 1999). Es kommt auch vor, dass Larven in Sojaplantagen auftreten, wo in den Plantagen durch die Wurzelschädigung Stabilitätsprobleme und/oder Wasser- und Nährstoffmangel resultieren (Potter, Potter & Townsend, 2006). Dennoch weisen die Larven im Vergleich zu adulten *P. japonica* in landwirtschaftlichen Flächen weniger Schäden auf (Hammond, 1994, Edwards, 1999).



**Abbildung 6: Befallene Grasfläche durch *P. japonica* Larven (EPPO, kein Datum b).**

Die von der EPPO Global Database (kein Datum a) kommunizierten Wirtspflanzenarten, welche durch *P. japonica* Larven befallen werden, sind folgend aufgelistet:

- |                        |                      |                       |
|------------------------|----------------------|-----------------------|
| • <i>Agrostis</i>      | • <i>Deschampsia</i> | • <i>Pennisetum</i>   |
| • <i>Axonopus</i>      | • <i>Eremochloa</i>  | • <i>Phalaris</i>     |
| • <i>Bouteloua</i>     | • <i>Festuca</i>     | • <i>Phleum</i>       |
| • <i>Calamagrostis</i> | • <i>Koeleria</i>    | • <i>Poa</i>          |
| • <i>Cynodon</i>       | • <i>Lolium</i>      | • <i>Stenotaphrum</i> |
| • <i>Dactylis</i>      | • <i>Paspalum</i>    | • <i>Zoysia</i>       |

## 2.4 Bekämpfungsstrategien gegen *Popillia japonica*

In der Schweiz wurden befristet in der Zeitperiode zwischen dem 20.07.2020 und 31.10.2020 für Ausnahmefälle vereinzelte Neonicotinoide gegen *P. japonica* bewilligt. Diese dürfen aber nur auf Anweisung kantonaler Pflanzenschutzdienste angewendet werden (Bundesamt für Landwirtschaft, 2020a). Biologische Bekämpfungsstrategien gegen *P. japonica* in der Schweiz sind in Entwicklung, jedoch noch nicht auf dem Markt erhältlich. Die Agroscope beschäftigt sich mit der Entwicklung einer Bekämpfungsmethode gegen *P. japonica* auf Basis von entomopathogenen Pilzen (Agroscope, 2019), während die ZHAW an der Entwicklung einer Bekämpfungsstrategie mit entomopathogenen Nematoden arbeitet (Hofer, 2019).

In den folgenden Abschnitten werden Monitoring- und Bekämpfungsmassnahmen ausserhalb der Schweiz dargestellt.

Zu **Monitoring**zwecken, kann mittels Bodenproben evaluiert werden, in welchen Zonen vermehrt *P. japonica* Larven vorkommen und wo im Folgejahr mit einem Befall zu rechnen ist (Jordan et al., 2012). Da adulte *P. japonica* jedoch sehr mobil sind, erweisen sich Bodenproben lokal als nicht zwingend aussagekräftig (Fleming, 1972, Potter, Potter & Townsend, 2006).

Das isolierte **Sexualpheromon** (Z)-5-(1-decenyl)dihydro-2(3H)-furanone dient zur Anlockung von adulten *P. japonica* Männchen. In Feldersuchen konnte mit der Grundform der Pheromone keine Anziehende Wirkung auf Männchen festgestellt werden. Jedoch eine reduzierte Interaktion zwischen Männchen und unverpaarten Weibchen. Versuche mit den zwei enantiomerischen Formen des Pheromons haben gezeigt, dass das (R)-Enantiomer (Japonilure) einen positiven Einfluss auf die Anziehung von Männchen hat. Der Einsatz von nur schon 1% (S)-Enantiomer erhöhte die Anziehung der Männchen stark (Tumlinson et al., 1977). Eine zusätzliche Anreicherung mit Phenethylpropionat, Eugenol und Geraniol, im Verhältnis 3:7:3, führt zu einem erfolgreichen Fangverhältnis (Ladd & McGovern, 1980).

Die Lockstoffe werden in Kombination mit **mechanischen Fallen** verwendet. Wenn die Fallen jedoch nicht täglich geleert werden, verschlechtert sich die Fangrate (Alm et al., 1996). Die Verwendung von Fallen zeigte selten einen reduzierenden Effekt auf die vorhandene Population. Teilweise wurden sogar Verschlimmerungen der Frassschäden in der Fallenregion beobachtet. Die Nutzung der Fallen macht v.a. dann Sinn, wenn eine neue oder sehr kleine Population reduziert werden soll (Fleming, 1969 und 1976, Wawrzynski & Ascero, 1998). Auch für Forschungszwecke (Potter & Held, 2002) im Zusammenhang mit **Monitoring** oder **Massenfang** (Piñero und Dudenhoeffer, 2018), kann die Falle verwendet werden. Die Nutzung der Fallen kann als Unterstützung weiterer Bekämpfungsstrategien und zur Identifizierung befallener Flächen dienen (Alm, et al., 1996). Auch werden die Fallen zur Zertifizierung von Gärtnerei-Pflanzen genutzt. So kann definiert werden, dass keine *P. japonica* in Waren vorkommen (Smitley, 1996).

Umgebaute Fallen können ebenfalls dafür genutzt werden, adulte *P. japonica* mit entomopathogenen Organismen, wie z.B. **Pilze** (*Metarhizium anisopliae* oder *Beauveria bassiana*), zu infizieren, damit diese die Organismen selbständig verbreiten (Lacey et al., 1994 und 1995, Klein & Lacey, 1999). Obwohl die Mortalität durch *M. anisopliae* und *B. bassiana* erst rund vier Tage nach der Infektion eintritt, findet eine natürliche Weiterverbreitung statt. Dabei liegt die Mortalitätsrate bei 43% (Lacey, Martins & Ribeiro, 1994) bis 70% (Giroux et al., 2015). Die Mortalitätsrate von *M. anisopliae* und *B. bassiana* bei *P. japonica* Larven liegt bei 37% (Giroux et al., 2015).

Das Mikrosporidium *Ovavesicula popilliae* hat ebenfalls eine letale Wirkung auf Larven, die Effizienz ist jedoch stark von den Applikationsparametern abhängig und ist deshalb als Produkt schwieriger zu nutzen (Andreadis & Hanula, 1987).

Eine weitere biocontrol Methode ist die Nutzung der **Bakterien** *Paenibacillus popilliae* und *Paenibacillus lentimorbus*. Diese führen zur «Milchkrankheit» bei *P. japonica* Larven. Die Sporen werden von den Larven über das Substrat oder die Wurzeln aufgenommen und keimen im Darm aus. Die vegetativen Zellen dringen ins Haemocoel ein und verringern den Fettanteil. Dies führt zu einer tödlichen Bakteriämie (Sharpe & Detroy, 1979). Feldversuche mit den Bakterien zwischen den Jahren 1939 und 1953 zeigten weder eine Erhöhung der Milchkrankheit, noch eine Verringerung der Larvenpopulation im Versuchsgebiet (Fleming, 1968). Neuere Versuche zeigen, dass sich die Bakterienpopulation nach einer Applikation in den Boden während 2-4 Jahren kontinuierlich aufbaut und den Larvenbestand nachhaltig reduziert (USDA-APHIS, 2015). Die Bakterien werden heute mehrheitlich durch Gartenbesitzer oder Gärtner genutzt (Shanovich et al., 2019).

Das Bakterium *Bacillus thuringiensis* ist hoch toxisch für *P. japonica* Larven (Ohba et al., 1992, Suzuki et al., 1992, Redmond et al., 2019). V.a. aufgrund der Konkurrenz durch chemisch Synthetischen Insektizide, welche erfolgreich gegen *P. japonica* eingesetzt werden, wurde die Vermarktung von *Bacillus thuringiensis* noch nicht aufgenommen (Potter & Held, 2002).

Eine weitere biologische Bekämpfungsstrategie ist **Neem**. Neem wird aus dem Baum *Azadirachta indica* gewonnen, welcher eine insektizide Wirkung auf diverse Organismen zeigt (Ladd, Jacobson & Buriff, 1978). Selbst bei einer geringen Applikation auf Blätter, zeigt Neem eine abschreckende Wirkung gegen adulte *P. japonica*. Neem hat zudem eine letale Wirkung auf das dritte Larvenstadium (Ladd, Warthen & Klein, 1984). Neem wird oftmals in biologisch bewirtschafteten Flächen genutzt (Shanovich et al., 2019).

**Natürliche Gegenspieler** sind ebenfalls eine weitere Option der biologischen Schädlingsbekämpfung gegen *P. japonica*. Zwischen den Jahren 1920 und 1933 wurden 49 natürliche Gegenspieler aus dem asiatischen und australischen Raum in den nördlichen USA freigesetzt. Nur wenige davon haben sich etabliert. Darunter *Tiphia vernalis*, *Tiphia popilliavora* (Rollwespen) und *Istocheta aldrichi* (Raupenfliege). Diese kommen jedoch nur vereinzelt vor und eine punktuelle

Anwendung hat keinen signifikanten Einfluss auf die *P. japonica* Population gezeigt (Fleming, 1968). *I. aldrichi* ist im japanischen Raum der Hauptparasit gegen *P. japonica*. Dort reguliert dieser ca. 90% des Bestandes, indem er seine Eier auf das adulte Tier legt und die frisch geschlüpften Larven den Käfer parasitieren (O'Hara, 2014).

Ameisen, Kurzflügler und Laufkäfer gelten ebenfalls als natürliche Gegenspieler und führen zu einer erheblichen Sterblichkeit von Eiern und jungen Larven (Terry, Potter & Spicer, 1993, Lopez & Potter, 2000, Zenger & Gibb, 2001a und 2001b). Maulwürfe, Stinktiere und Waschbären graben Larven zur Nahrungsaufnahme aus, verursachen in der Regel jedoch grössere Schäden auf den Feldern, als es die *P. japonica* Larven tun würden (Potter, 1998). Stare, Krähen, Grackeln, Möven, Hühner und andere Vogelarten nutzen die Larven ebenfalls als Nahrungsquelle (Fleming, 1968). In einem Versuch mit Hühnern, konnte trotz einer Verminderung der *P. japonica* Population, kein geringerer Schaden in einer naheliegenden Apfelplantage festgestellt werden (Clark & Gage, 1996).

Alternativ zur Bekämpfung mit Organismen, wurden auch verschiedene Ansätze mit punktuelltem **Feldmanagement** getestet: Reduzierte oder keine Bewässerung der Grasflächen in den Spitzenzeiten der Flugzeit führte dazu, dass die Weibchen entsprechende Felder zur Eiablage meiden. Die Erhöhung der Feldschnitthöhe auf über 18 cm und die Anwendung von Aluminiumsulfat zur Versauerung der Böden führte zu einer signifikanten Verringerung der Eiablage in den Feldern (Potter et al., 1996). Die Anwendung von Kalkstein (zur Erhöhung des pH Wertes) (Vittum, 1984, Vittum & Tashiro, 1980, Vittum & Morzuch, 1989), die Verdichtung von Böden (Potter et al., 1996) oder eine Stickstoffdüngung (Davidson & Potter, 1995), hatten allesamt keinen mindernden Effekt auf die Eiablage oder die Larvenentwicklung im Feld. Felder welche wenig bis gar nicht gepflügt werden, wiesen einen höheren Befallsgrad auf (Hammond & Stinner, 1987).

Versuche zeigten, dass wenn in der **Fruchtfolge** auf eine Mais- eine Sojaplanlage folgte, die *P. japonica* Population vergleichsweise stärker wuchs, wie wenn zwei Jahre in Folge Soja angepflanzt wurde (Smith, Hammond & Stinner, 1988). Zudem konnte festgestellt werden, dass wenn Sojafelder streifenweise abwechselnd mit Zwerg- oder Hochmoor-Sorghum (je nicht-Wirtspflanzen) bepflanzt wurden, eine Reduktion der Population stattfindet (Bohlen & Barrett, 1990, Holmes & Barrett, 1997).

Der Einsatz von **UV-reduzierenden Folientunneln** hat eine signifikante Reduktion von adulten *P. japonica* auf Himbeerplantagen gezeigt. Durch dass die Population aber nur reduziert und nicht komplett verdrängt wird, handelt es sich bei dieser Methode um eine additive Bekämpfungsstrategie (Cramer et al., 2019).

Ein ganz anderer Bekämpfungsansatz ist die **Massensterilisierung**. Männliche *P. japonica* wurden mittels Gammastrahlung unfruchtbar gemacht und in Tennessee wöchentlich freigelassen.

Die Verpaarung führte zu unbefruchteten Eiern und sollte die Population nachhaltig reduzieren. Der Effekt in dieser Studie trat jedoch in beiden Versuchsjahren zu spät ein, womit der Effekt nicht dem Aufwand entsprach. Die Studie, sowohl die Strategie wurden seither nicht mehr weiterverfolgt (Ladd et al., 1972).

In den USA wird zur Bekämpfung von *P. japonica* häufig **Insektizid** verwendet. Beispielsweise wird das Insektizid Imidacloprid (Chlornicotinyl) oder Halofenozide (Bisacylhydrazin) genutzt (Potter, 1998, Krupke, Obermeyer & Bledsoe, 2017, Varenhorst & Wagner, 2017, Dewerff et al., 2019a und 2019b). Jedoch sind bereits Resistenzen gegen diese Insektizide bekannt und eine Weiterentwicklung der Resistenzen ist nicht ausgeschlossen (Harry, 1974).

Das Insektizid Carbaryl wirkt ziemlich effizient gegen adulte *P. japonica* und wird auf Blätter oder Blüten aufgetragen (Potter, 1998).

Allgemein konnten bei verschiedenen Insektiziden bereits Resistenzen festgestellt werden. Die meisten dieser Insektizide wurden jedoch bereits aus Umwelt- und gesundheitlichen Problemen in den USA verboten (EPA, 2003).

## **2.5 Entomopathogene Nematoden als Bekämpfungsmethode gegen *Popillia japonica***

Entomopathogene Nematoden orientieren sich bei *P. japonica* anhand der Konzentration der CO<sub>2</sub> Absonderung (Gaugler & Campbell, 1991), sowohl anderer vom Wirtsorganismus ausgehende flüchtige Stoffe (Lewis, Gaugler & Harrison, 1993). Ebenfalls reagieren die Nematoden auf Kontaktsignale (Lewis, Gaugler & Harrison, 1992) und Darminhalte (Grewal, Gaugler & Lewis, 1993, Grewal, Gaugler & Selvan, 1993).

Nachdem die juvenile entomopathogene Nematoden ihren Wirt gefunden haben, dringen diese über die Kutikula, oder natürliche Körperöffnungen ein (Poinar, 1979). Sobald die Nematoden eingedrungen sind, geben sie symbiontische Bakterien ins Hämözöl ab, welche zur Tötung des Wirtsinsekten führt. Bei *Steinernema sp.* sind die symbiontischen Bakterien beispielsweise *Xenorhabdus sp.* und bei *Heterorhabditis sp.*, *Photorhabdus sp.* (Grewal et al., 1999). Die Nematoden entwickeln sich im toten Wirt weiter, vermehren sich und die neue Generation Nematoden schwärmt aus, um sich einen neuen Wirt zu suchen (Poinar, 1979).

*P. japonica* Larven können sich bis zu einem bestimmten Rahmen gegen das Eindringen von Nematoden wehren. Z.B. indem sie mit den Beinen und Mundwerkzeugen versuchen die Nematoden auf der Kutikula abzustreifen (Gaugler, Wang & Campbell 1994, Wang, Campbell & Gaugler, 1995), Verhaltensanpassung (z.B. aggressive Verhaltenszüge) vornehmen (Schroeder et al., 1993, Gaugler, Wang & Campbell, 1994), Darminhalten mit höherem pH-Wert absondern, Verkapselung in der Hämolymphe (Immunabwehr) produzieren (Wang, Gaugler & Cui, 1994),

siebartige Strukturen vor den Atemkanälen oder dickere peritrophische Membranen entwickeln (Forschler & Gardner, 1991).

Um die Nematoden für die Bekämpfung verwenden zu können, müssen diese erst vermehrt werden. Zur künstlichen Vermehrung von entomopathogenen Nematoden, gibt es *in vivo* oder *in vitro* Varianten. Für die Erhaltung der Nematodenstämmen z.B. in Labors, wird oftmals die *in vivo* Methode mit Wirten als Vermehrungsform genutzt (wie auch in dieser Masterarbeit, vergl. Kapitel 3.1.6). Dabei können *Lepidoptera*, *Coleoptera* oder *Diptera* als Wirt verwendet werden. Für eine kommerzielle Massenvermehrung ist diese Methode jedoch zu aufwändig, da diese eine grosse Anzahl Wirtsinsekten, mehr Zeit und erhöhte Kosten in Anspruch nehmen. Die *in vitro* Methode, welche vermehrt für die kommerzielle Vermehrung von entomopathogenen Nematoden genutzt wird, kann z.B. auf einem Lipid-Agar durchgeführt werden. Auf den Agarplatten wird das symbiotische Bakterium aufgetragen und nach 24-48 h mit Nematoden versetzt. Nach ca. 12 Tagen hat sich eine neue Generation Nematoden entwickelt, kann geerntet und für weitere Zwecke, wie z.B. Bekämpfungen, verwendet werden (McMullen & Stock, 2014).

Die Nachteile von entomopathogenen Nematoden als Bekämpfungsmittel, sind oftmals hohe Kosten, limitierte Verfügbarkeit, eine verhältnismässig kurze Lebensdauer sowohl Empfindlichkeit gegenüber Hitze, Bodenfeuchte, Sonnenlichtexposition und weitere biotische Faktoren (Georgis & Gaugler, 1991, Gilmore & Potter, 1993, Klein, 1993).

Um die Mortalitäts-Effizienz zu steigern, ist die kombinierte Anwendung mit anderen Bekämpfungsstrategien sinnvoll. Beispielsweise lässt sich die von Bakterien hervorgerufene Milchkrankheit oder die Anwendung von *Metarhizium* (Bertoglio et al., 2018) optimal mit der Anwendung von entomopathogenen Nematoden verbinden (Thurston, Kaya & Gaugler, 1994). Auch eine Kombination mit Insektiziden ist möglich (Koppenhöfer & Kaya, 1998, Koppenhöfer, Grewal & Kaya, 2000).

Nachfolgend werden Nematodenarten in der Tabelle 1 aufgelistet, bei welchen eine Parasitierung von *P. japonica* beobachtet werden konnte (inkl. entsprechender Publikationen), sowohl deren geographisches Vorkommen:

**Tabelle 1: Nematoden mit einem letalen Effekt auf *P. japonica* und dessen Vorkommen.**

Nematode mit Effekt auf <i>P. japonica</i>	Vorkommen	Kommentar
<b><i>Heterorhabditis bacteriophora</i></b> (Vilani, Wright, 1988, Wright, Vilani, Agudelo-Silva, 1988, Georgis & Gaugler, 1991, Alm et al., 1992, Lacey et al., 1993, Selvan et al., 1993, Simoes et al., 1993, Downing, 1994, Gaugler et al., 1994, Wang et al., 1994, Grewal et al., 1995, Wang et al., 1995, Campbell et al., 1998, Wang & Gaugler, 1998, Koppenhofer et al., 2000, Lawrence A. Lacey et al., 2001, Li et al., 2007, Morales-Rodriguez & Peck, 2009, Power et al., 2009, Morris & Grewal, 2011, Paoli, Marianelli, Binazzi, et al., 2017, Paoli, Marianelli, Torrini, et al., 2017, Helmberger et al., 2018, Marianelli et al., 2018)	Asien, Europa, Nordamerika, Ozeanien und Südamerika (CABI, 2019a).	Wird bereits als Produkt in der Schweiz gegen verschiedene Schädlinge angeboten (Andermatt Biocontrol, kein Datum).  Wird als natürlicher Feind von <i>P. japonica</i> gelistet (CABI, 2019b).
<b><i>Heterorhabditis heliothidis</i></b> (CABI, 2019b)	Neuseeland (Wouts, 1979)	Wird als natürlicher Feind von <i>P. japonica</i> gelistet (CABI, 2019b).
<b><i>Heterorhabditis georgiana</i></b> (Morris & Grewal, 2011)	Giorgia, USA (Mbata, Shapiro-Ilan & Nguyen, 2008)	
<b><i>Heterorhabditis marelatus</i></b> (Mannion et al., 2000)	Oregon, USA (Liu & Berry, 1996)	Wird als natürlicher Feind von <i>P. japonica</i> gelistet (CABI, 2019b).
<b><i>Heterorhabditis megidis</i></b> (Poinar et al., 1987)	Weltweit (University of Nebraska, kein Datum)	Wird als natürlicher Feind von <i>P. japonica</i> gelistet (CABI, 2019b).  Bis vor wenigen Jahren als Produkt in der Schweiz gegen Schädlinge angeboten (persönliche Mitteilung, E. Fischer, 2020)

Nematode mit Effekt auf <i>P. japonica</i>	Vorkommen	Kommentar
<b><i>Hexameris popilliae</i></b> (Mazza et al., 2017)	Piemont, Italien (Mazza et al., 2017)	
<b><i>Neoaplectana hopta</i></b> (Turco, 1970)	New Jersey, USA (Turco, 1970)	
<b><i>Steinernema anomali</i></b> (Selvan et al., 1994)	Spanien (Garcia del Pino & Palomo, 1995) und Russland (Poinar, 1990)	
<b><i>Steinernema carpocapsae</i></b> (Georgis & Gaugler, 1991, Cui et al., 1993, Lacey et al., 1993, Simoes et al., 1993, Wang et al., 1994, Campbell et al., 1998, Lawrence A. Lacey et al., 2001, Morris & Grewal, 2011, Marianelli et al., 2018)	Afrika, Asien, Europa, Nordamerika, Oceanien und Südamerika (CABI, 2019c).	<p>Sind eher lokal aktiv, wandern weniger als <i>S. glaseri</i> oder <i>H. bacteriophora</i> und sind deshalb weniger effizient (Lewis, Gaugler &amp; Harrison, 1992, Lewis, Gaugler &amp; Harrison, 1993, Grewal, Grewal &amp; Gaugler, 1995).</p> <p>Sind empfindlicher gegenüber CO<sub>2</sub> Ausstös- sen und identifizieren deshalb die Larven schneller (Gaugler &amp; Campbell, 1991).</p> <p>Wird bereits als Produkt in der Schweiz gegen verschiedene Schäd- linge angeboten (Andermatt Biocontrol, kein Datum).</p> <p>Wird als natürlicher Feind von <i>P. japonica</i> gelistet (CABI, 2019b).</p>



Nematode mit Effekt auf <i>P. japonica</i>	Vorkommen	Kommentar
<b><i>Steinernema feltiae</i></b> (Lacey et al., 1993, Campbell et al., 1998, Li et al., 2007, Helmberger et al., 2018)	Afrika, Asien, Europa, Nordamerika, Ozeanien und Südamerika (Cabi, 2019d).	Wird bereits als Produkt in der Schweiz gegen verschiedene Schädlinge angeboten (Andermatt Biocontrol, kein Datum).  Wird als natürlicher Feind von <i>P. japonica</i> gelistet (CABI, 2019b).
<b><i>Steinernema glaseri</i></b> (Wright, Vilani & Agudelo-Silva, 1988, Vilani & Wright, 1988, Alm et al., 1992, Cui et al., 1993, Lacey et al., 1993, Selvan et al., 1993, Simoes et al., 1993, Selvan et al., 1994, Wang et al., 1994, Lacey et al., 1995, Wang et al., 1995 Yeh & Alm, 1995, Wang & Gaugler, 1998, Koppenhofer et al., 2000, Lawrence A. Lacey et al., 2001, Li et al., 2007)	Asien, Europa, Nordamerika Ozeanien und Südamerika (CABI, 2019e).	Wird als natürlicher Feind von <i>P. japonica</i> gelistet (CABI, 2019b).
<b><i>Steinernema kushidai</i></b> (CABI, 2019b)	Japan (Mamiya, 1988)	Effizienter als <i>H. bacteriophora</i> und <i>S. glaseri</i> (Koppenhofer et al., 2000).  Wird als natürlicher Feind von <i>P. japonica</i> gelistet (CABI, 2019b).
<b><i>Steinernema riobravis</i></b> (CABI, 2019b)	Nordamerika und Südamerika (CABI, 2019f)	Wird als natürlicher Feind von <i>P. japonica</i> gelistet (CABI, 2019b).
<b><i>Steinernema scapterisci</i></b> (CABI, 2019b)	Giorgia, Mississippi, Puerto Rico (Frank, 2009), Uruguay (Nguyen & Smart 1990), Argentinien und Brasilien (Nguyen, 1999)	Wird als natürlicher Feind von <i>P. japonica</i> gelistet (CABI, 2019b).

Nematode mit Effekt auf <i>P. japonica</i>	Vorkommen	Kommentar
<b><i>Steinernema scarabaei</i></b> (Li et al., 2007)	New Jersey, USA (Stock, Patricia & Koppenhöfer, 2003)	Wird als natürlicher Feind von <i>P. japonica</i> gelistet (CABI, 2019b).

In den oben genannten Studien wurden teilweise unterschiedliche regionale Stränge der Nematodenarten getestet, wobei üblicherweise keine signifikanten Abweichungen in Bezug auf die Mortalitätsrate von *P. japonica* nachzuweisen war (Selvan et al., 1993).

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Nematoden Extraktion**

Zur Bekämpfung von *Popillia japonica*, werden endemische Nematodenarten gesucht, welche eine hohe Mortalität gegenüber *P. japonica* Larven aufweisen. Hierfür wurden in verschiedenen Regionen der Schweiz Bodenproben entnommen, um daraus entomopathogene Nematoden für weiterführende Experimente zu extrahieren.

Für die *in vivo* Extraktion und Vermehrung wurden die von McMullen und Stock (2014) zusammengefassten Methoden angepasst und verwendet. Die in dieser Masterarbeit angewendeten Methoden werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

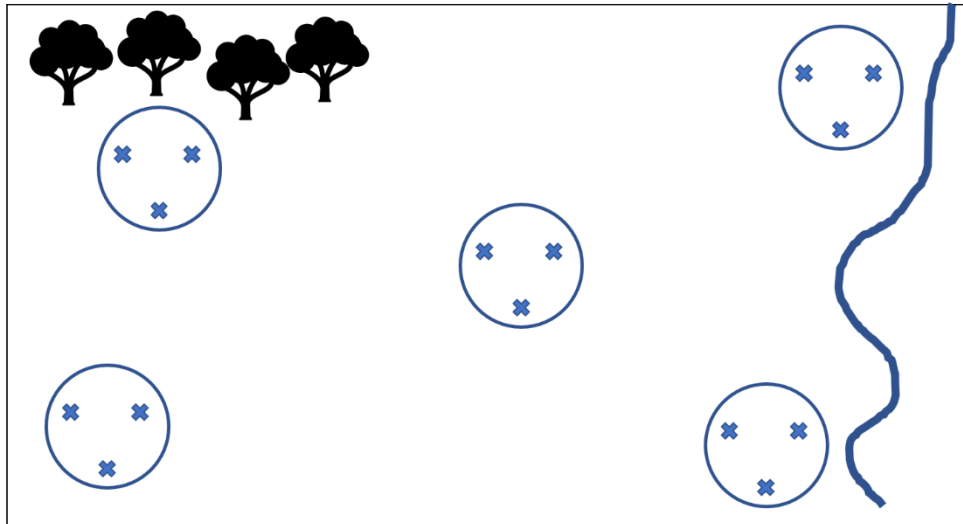
##### **3.1.1 Sammlung Bodenproben**

Zur Sammlung entomopathogener Nematoden, wurden Standorte in der Schweiz definiert (ArcGIS Probekarte siehe Abbildung 21), wo das Vorkommen von Engerlingen (z.B. Maikäferlarven) bekannt war. Das natürliche Vorkommen von entomopathogenen Nematoden ist an Standorten mit Wirtsaufkommen wahrscheinlicher. Entsprechende Sammelstandorte wurden mithilfe von Beratungsdiensten und Erfahrungswerten von Forschenden zusammengestellt.

Je nach Standort (z.B. landwirtschaftliche Fläche) wurde abhängig von der Grösse und Vielfalt der Fläche vor Ort entschieden, wie viele Proben gesammelt werden. Bevorzugterweise fiel die Entscheidung auf Sammelpunkte, wo Engerlinge vermutet wurden. Bei einem grossen Standort mit unterschiedlichen Strukturen, wie z.B. Bäumen und Gewässern konnten beispielsweise sieben Proben gesammelt werden. Wobei ein kleines Feld mit wenigen Strukturen nur ein bis zwei Proben beinhalten konnte.

Jede der gesammelten Proben war eine Mischprobe. Dabei wurden im Umkreis von ca. fünf Metern, drei Substratproben mit einer Tiefe von ca. 5-15 cm entnommen (vergl. Abbildung 7) und in einem Kübel durchmischt.

Die Koordinaten und Strukturen (z.B. Waldrand) der einzelnen Standorte wurden notiert und die Töpfe mit den Substratproben beschriftet.



**Abbildung 7: Beispiel Probenahme: fünf gesammelte Mischproben (Kreis) à je drei Löcher (x); jeweils bei Strukturen (z.B. Bäume, Fluss) und auf dem Feld.**

### 3.1.2 Vorbereitung und Inkubation der Bodenproben

Die Mischproben wurden in Kübeln transportiert und bis zur Bearbeitung in einem Kühlraum bei 4°C gelagert.

Aus den einzelnen Kübeln wurden je zwei 50 ml Falcontubes Erde entnommen. Diese dienen zur weiteren Bodenanalyse (z.B. pH-Wert und Körnung) und wurden bei -20°C zur Lagerung eingefroren.

Anschliessend wurden die Bodenproben einzeln mit einem 1 cm Sieb homogenisiert und erneut durchmischt. Die gesiebte Probe wurde in je drei 13 cm Töpfe (ca. 1l), welche mit einem 60-90 µm Netz (SEFAR S-TEX, PA 60-80) ausgekleidet waren, bis unter dem Rand befüllt. Beim Befüllen wurden pro Topf 8 *Galleria mellonella* Larven (drittes Larvenstadium) (Köderwirte aus Fischereifachladen H.R. Hebeisen, Zürich) auf drei Ebenen im Topf verteilt. Das Netz wurde im Anschluss mit einem Gummiband verschlossen und gekehrt, sodass die Öffnung nach unten zeigte. Dies reduziert die Angriffsfläche (Falten), welche durch aufsteigende *G. mellonella* durchfressen wird. Das Netz reduziert die Fluchtgefahr von *G. mellonella* aber auch von weiteren Bodenorganismen, wie z.B. Ameisen. Die Töpfe wurden mit Etiketten beschriftet und auf je einen Unterteller gestellt (vergl. Abbildung 8).



**Abbildung 8: Töpfe mit Bodenproben in Netzen.**

Vor der Inkubation wurden die Proben, falls diese nicht bereits feucht waren, mit Leitungswasser bewässert. Dabei galt es zu beachten, dass die Proben während der Versuchsdauer nicht im stehenden Wasser gelagert wurden, jedoch auch keine Austrocknung stattfand. In der Halbzeit der Inkubation wurden die Proben bei Bedarf erneut mit Leitungswasser bewässert.

Die Töpfe wurden anschliessend während 7 Tagen bei einer Temperatur von 20°C und einer Luftfeuchtigkeit von 90% ohne Licht inkubiert.

### 3.1.3 Ernte potenziell befallener *Galleria mellonella* Larven

Nach 7 Tagen wurden die Netze in einer Plastikwanne geöffnet. Im Substrat wurde nach toten *G. mellonella* Larven gesucht (vergl. Abbildung 9). Abgesehen von komplett schwarzen oder gestreckten Larven, wurden alle toten Larven in Petrischalen (vergl. Kapitel 3.1.4) übertragen.

Die verbleibenden Larven und das Substrat wurden anschliessend in verschlossenen Säcken über die Kehrichtverbrennung entsorgt. Die Netze wurden während 48 h bei -20°C tiefgekühlt und anschliessend von Hand gewaschen. Sofern die Netze mehrheitlich in Takt waren, konnten sie, wie auch die Töpfe und Unterteller, wiederverwendet werden.



**Abbildung 9: Geöffnetes Netz mit Probe zur Durchsuchung nach toten *G. mellonella* Larven.**

### 3.1.4 Inkubation potenziell befallener *Galleria mellonella* Larven (White-trap-Methode)

Eine Petrischale mit einem Durchmesser von 145 mm wurde mit 1 cm Leitungswasser gefüllt. In die Mitte der mit Wasser gefüllten Petrischale wurde ein Deckel oder Boden einer kleineren Petrischale mit einem Durchmesser von 60 mm mit der Öffnung gegen unten positioniert, sodass die geschlossene Fläche aus dem Wasser ragte. Ein Filterpapier mit einem Durchmesser von 125 mm wurde in eine Kreuzform geschnitten und auf die kleine Petrischale gelegt. Die vier Enden des Filterpapiers ragten ins Wasser und saugten sich damit auf. Die aussortierten *G. mellonella* Larven wurden anschliessend je in eine beschriftete Petrischale in die Mitte des Kreuzes gelegt (vergl. Abbildung 10)



**Abbildung 10: Vorrichtung zur Nematodenextraktion aus *G. mellonella* Larven.**

und während 12 Tagen unter den gleichen Konditionen wie die Bodenproben inkubiert (dunkel, 20°C, 90% Luftfeuchtigkeit). Während dieser Zeit konnten die Nematoden aus der *G. mellonella* Larve ausschwärmen und wanderten über das Filterpapier in das umliegende Leitungswasser.

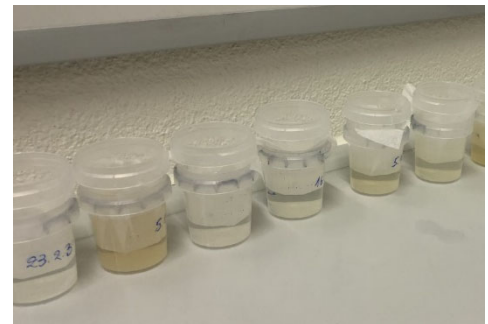
Nach 12 Tagen wurde mit einem Binokular das Wasser, sowie die Oberfläche der *G. mellonella* Larve nach Nematoden abgesucht. Es galt dabei zu unterscheiden, ob es sich tatsächlich um entomopathogene Nematoden, oder um andere Organismen, wie z.B. nematodenähnliche Saprobionten handelte. Saprobionten bewegen sich meist sehr schnell. Ihr Vorder- und Hinterleib peitschen symmetrisch von links nach rechts. Nematoden wiederum schlängeln sich in der Regel vorwärts oder begeben sich in ringförmige Positionen. Gab es dennoch Unsicherheiten, ob es sich tatsächlich um entomopathogene Nematoden handelte, wurde die Probe mitgezogen und mittels PCR und Sequenzierung (vergl. 3.2 Identifikation Nematoden) identifiziert.

Petrischalen, wo keine Nematodenaktivität beobachtet werden konnte, wurden über die Kehrichtverbrennung entsorgt.

### 3.1.5 Nematoden Filtern

Im Falle von Nematoden auf der Oberfläche der *G. mellonella* Larve, wurden diese durch die Applikation von Leitungswasser aus einer Spritzflasche in das umliegende Wasser geschwemmt. Falls eine Nematoden-Aktivität unter der Cuticula von der *G. mellonella* Larve festgestellt wurde, bespritzte man diese erst zur Befeuchtung mit Wasser aus der Spritzflasche und verschnitt diese dann vorsichtig mit einem Skalpell auf dem Filterpapier. Nach etwa einer Stunde ist jeweils ein Teil der freigelegten Nematoden in das umliegende Wasser gewandert.

Bei Nematoden im Wasser, wurden die kleine Petrischale, das Filterpapier und die *G. mellonella* Larve aus dem Wasser entnommen und verworfen. Das mit Nematoden versetzte Wasser wurde in einen beschrifteten Filterbehälter (vergl. Abbildung 11) gegeben. Dieser bestand aus zwei gestapelten 50 ml Traiteurbecher (48 mm) (das Obere mit ausgeschnittenem Boden) und zwei verschnittenen Milchfilter (190 mm) Vierteln, welche zwischen die beiden Becher geklemmt wurde.



**Abbildung 11: Filterbehälter mit zu filtrierenden Nematoden in Flüssigkeit.**

Die Petrischale wurde mit ein wenig Leitungswasser aus der Spritzflasche nachgespült. Auch diese Flüssigkeit wurde in den Filterbehälter gegeben. Die Flüssigkeit wurde bis mindestens zum Filterpapier aufgefüllt, damit die Nematoden durchwandern konnten.

Nach einer Stunde wurden der obere Traiteurbecher und der Milchfilter vorsichtig entnommen. Der grösste Teil der Fremdkörper, wie z.B. Milben oder Filterpapierfasern, wurde oberhalb des Milchfilters gefangen und konnte somit entfernt werden. Der Milchfilter wurde in der Kehrichtverbrennung entsorgt. Nach der Entnahme der genannten Elemente, wurde erneut 5 Minuten gewartet, damit sich die aufgewirbelten Nematoden wieder auf dem Boden des Bechers setzen

konnten. Anschliessend wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgegossen, sodass nur noch Nematoden und wenig Flüssigkeit im Becher verblieben.

Die Suspension wurde in eine 145 mm Petrischale übertragen. Der Traiteurbecher wurde mit ein wenig destilliertem Wasser aus der Spritzflasche nachgespült. Die Petrischale wurde mit zusätzlichem destilliertem Wasser aufgefüllt, sodass der Boden mit Wasser bedeckt war.

Die Petrischale wurde beschriftet und mit Parafilm verschlossen. Anschliessend wurde die Petrischale mit den Nematoden im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Die Traiteurbecher wurden erst mit Wasser, dann mit Alkohol zur Wiederverwendung gereinigt.

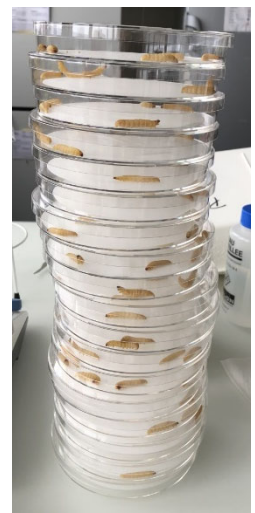
### 3.1.6 Reinfektion mit *Galleria mellonella* Larven

Die filtrierte Nematoden waren in der Regel nach der ersten Extraktion noch nicht in einer Reinkultur. Durch eine Reinfektion konnte eine zusätzliche Reinigung durchgeführt werden.

Dafür wurde eine 145 mm Petrischale mit einem 125 mm Filterpapier belegt und befeuchtet (kein stehendes Wasser) (vergl. Abbildung 12). Es wurden pro Petrischale fünf *G. mellonella* Larven ausgelegt. Jede Larve wurde mit höchstens 1000 Nematoden beträufelt (besser ca. 50 Nematoden).

Nach 5 Tagen im Dunkeln bei Raumtemperatur, wurde erstmals nach toten Larven gesucht. Verpilzte oder gestreckte (aufgrund fehlenden Muskeltonus) Larven wurden verworfen. Die toten Larven wurden mit destilliertem Wasser aus der Spritzflasche gereinigt. Dabei wurden die Larve vorsichtig an einem Ende mit einer Fangpinzette gehalten, während sie abgespritzt wurde und anschliessend an der anderen Seite gehalten, um die durch die Pinzette verdeckte Seite zu reinigen. So werden allfällige Saprobionten mehrheitlich entfernt (Taboga, 1981). Nach der Reinigung wurden die Larven in eine, wie im Kapitel 3.1.4 beschriebene Petrischale deponiert und anschliessend wie im Kapitel 3.1.5 filtriert. Die Larven wurden anschliessend nach Möglichkeit täglich kontrolliert und neue tote Larven wurden weiterverarbeitet.

Nach der Reinfektion und Filtration wurden die Petrischalen mit Nematoden erneut bei 4°C im Kühlschrank gelagert.



**Abbildung 12:** Petrischalen mit Filterpapier und *G. mellonella* Larven zur Nematoden-Reinfektion.

### **3.2 Identifikation Nematoden**

Um eine artgenaue Identifikation der gesammelten Nematoden zu gewährleisten, wurde dessen DNA aufgereinigt, mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt, sequenziert und über Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) einem Organismus zugeordnet.

#### **3.2.1 Vorbereitung Extraktion**

Vorgängig wurden die forward und reverse Nematoden Universalprimer pXb\_101\_f (5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3') und pN\_26S\_r (5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3') bei Microsynth bestellt (Produktdetails siehe Anhang D).

Unter dem Binocular wurden die Petrischalen mit den Nematoden begutachtet. Es wurden Auffälligkeiten, wie z.B. potenzielle Verunreinigungen, andere Organismen als Nematoden, oder geringe Anzahl Nematoden notiert. Pro Petrischale wurden 25 µl Nematodensuspension entnommen. Im Optimalfall wurde die Nematodensuspension direkt unter dem Binocular entnommen, um sicher zu gehen, dass so viele Nematoden wie möglich pipettiert wurden. Die Nematodensuspension wurde in ein 2 ml Tube übertragen und nummeriert (Deckel und seitlich). Die Nummerierung, die entsprechende Zugehörigkeit und allfällige Bemerkungen wurden in einer Excelliste dokumentiert.

Jedes Tube wurde mit einer 5 mm Stahlkugel versehen und bei einer Frequenz von 30 Bewegungen/Sekunde während 1 min im TissueLyser II homogenisiert, um die DNA freizulegen. Im Anschluss wurde die Suspension für die DNA Extraktion genutzt.

#### **3.2.2 DNA Extraktion**

Die DNA Extraktion zur Aufreinigung der DNA wurde mit dem Macherey-Nagel NucleoSpin Tissue Kit von Fisher Scientific nach Kit-Anleitung (vergl. Anhang A) durchgeführt.

Abweichungen zur Anleitung:

- Die Lysierungs-Inkubationszeit dauerte 2h.
- Die DNA wurde aufgrund der geringen Konzentration in nur 60 µl Buffer eluiert, um die Konzentration zu erhöhen.

Die extrahierte DNA wurde direkt für die PCR vorbereitet oder alternativ im Kühlschrank bei 4°C während ein paar Wochen aufbewahrt. Eine längere Lagerung der Proben sollte im Tiefkühler bei -20°C erfolgen.



### 3.2.3 Durchführung PCR

In der PCR wurde die DNA vervielfältigt (SOP vergl. Anhang B). Dafür wurde ein Mastermix unter sterilen Bedingungen in einer Kapelle mit autoklavierten Pipettenspitzen vorbereitet. Pro Einheit (Proben + Negativkontrollen + 2-4 Reserven) wurden folgende Komponente aus der Tabelle 2 gerechnet:

**Tabelle 2: Zusammensetzung Mastermix.**

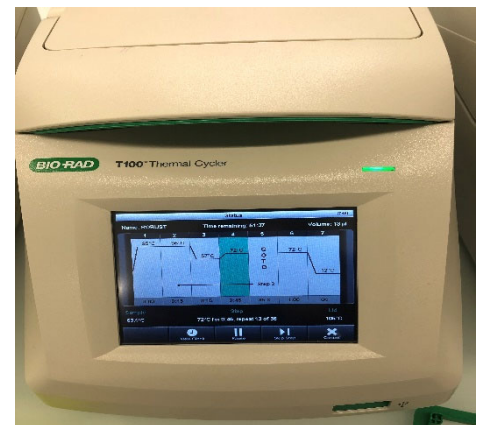
ddH <sub>2</sub> O	4 µl
10 µM vw-Primer	0.625 µl
10 µM rw-Primer	0.625 µl
KAPA2G Robust DNA Polymerase von Kapa Byosystems (Produktdetails siehe Anhang C)	6.25 µl

Je 11.5 µl Mastermix wurde pro Probe in beschriftete, autoklavierte achter 0.2 ml PCR-Röhrchenstreifen pipettiert. Anschliessend wurde zusätzlich je 2 µl aufgereinigte Probe in die Röhrchen pipettiert.

Als Negativkontrolle wurde eine Reinstwasserprobe pro Durchgang genutzt.

Nach dem Befüllen der Röhrchen, wurden diese gevortext und anschliessend kurz zentrifugiert.

Der Thermal Cycler T100 von BioRad (vergl. Abbildung 13) wurde mit den Röhrchen beladen und folgendes PCR-Programm (Tabelle 3) wurde aktiviert:



**Abbildung 13: Thermal Cycler T100 von Biorad mit PCR-Einstellung für KAPA Robust.**

**Tabelle 3: PCR Programm KAPA Robust mit leichten Anpassungen.**

Initiale Denaturierung	95°C für 3 min	1 Zyklus
Denaturierung	9°C für 15 s	35 Zyklen
Anlagerung	57°C für 15 s	
Elongation	72°C für 45 s	
Finale Elongation	72°C für 1 min	1 Zyklus

Die vervielfältigte DNA (gevortext und zentrifugiert) wurde direkt im Anschluss für eine Gelchromatographie und später für die Sequenzierung verwendet. Eine allfällige Lagerung erfolgte im Tiefkühler bei -20°C.

### **3.2.4 Gelelektrophorese**

Während die PCR lief, wurde das Gel für die Gelelektrophorese vorbereitet (SOP vergl. Anhang E). Für ein grosses Gel (maximal 58 Proben + 2 Leitern), wurde 1 g Agarose abgewogen und mit 100 ml 1x TAE-Puffer in einer Schottflasche gelöst. Für ein kleines Gel (maximal 14 Proben + 2 Leitern) wurde die Hälfte der Inhalte gemischt. Die Suspension wurde mit einem Papiertuch-Stopfen (Auslaufschutz), in der Mikrowelle (Intertronic) erhitzt, bis diese kochte. Die Schottflasche wurde dann mit hitzebeständigen Handschuhen entnommen, geschwenkt und wieder bis zum Kochen erhitzt. Dies wurde so oft wiederholt, bis die Flüssigkeit komplett durchsichtig und keine Fragmente mehr zu erkennen waren.

Das verflüssigte Gel wurde mit 40 µl 1000x GelRed gemischt und direkt in die Vorbereitungsvorrichtung mit Gelschale inkl. Kämmen (Grösse entsprechend der Anzahl Proben + Leiter pro Zeile; maximal zwei Zeilen) gegeben. Jede Interaktion mit GelRed erfolgte mit Laborhandschuhen in definierten Arbeitsbereichen, inkl. definierten Arbeitsutensilien, da eine kanzerogene Wirkung durch diese Substanz nicht ausgeschlossen ist.

Nach frühestens 30 min wurden die Kämmen vorsichtig entfernt und die Schale mit dem Gel aus der Vorbereitungsvorrichtung entnommen. Das Gel wurde mit der Schale in das mit 1x TAE-Puffer gefüllte Bio-Rad Sub-Cell GT gelegt.

In jedes Kamm-Loch wurden je 3 µl PCR-Proben pipettiert. Pro Zeile wurde an erster oder letzter Stelle zur Orientierung eine DNA-Leiter pipettiert.

Das Gel wurde mit einem Bio-Rad PowerPac Basic bei 110 Volt während mindestens 20 min laufen gelassen. Ab 20 min wurde kontrolliert, dass die Banden nicht in die nächste Zeile laufen oder das Gel verlassen.

Das Gel wurde mit Laborhandschuhen ohne Gelschale in das E-Box VX5 Gel Documentation System (Vilber) gegeben und mit Weisslicht positioniert (offene Klappe). Anschliessend wurde das Gel mit UV-Licht beleuchtet und über das interne Computersystem aufgehellt (geschlossene Klappe). Sobald die Banden gut erkennbar waren, wurde das Bild auf einem Stick gespeichert und auf einen Computer übertragen. Dann wurde das Gel fachgerecht entsorgt.

Das Gelbild wurde mit dem Programm Image Lab zur Orientierung für die Auswertung beschriftet (Gelbilder vergl. Anhang F).

Falls einzelne Resultate nicht den Erwartungen entsprachen (z.B. keine Bande), wurden diese vereinzelt Proben wiederholt. Bei Fehlern, welche sich über das ganze Gel erstreckten und die Vermutung bei einem Mangel bei der PCR lag, wurde ab Kapitel 3.2.3 Durchführung PCR wiederholt. Bei sonstigen bzw. nicht identifizierbaren Fehlern wurde von Anfang an (Kapitel 3.2.1 Vorbereitung Extraktion) wiederholt.

Bei einer positiven Negativkontrolle, wurde eruiert, weshalb diese positiv ausgefallen ist (z.B. unreines Arbeiten, DNA-Aerosole, falsches Pipettieren o.Ä.) und ggf. wurde die PCR wiederholt.

Proben welche in den Gelbildern eine positive Bande aufwiesen, wurden sequenziert.

### 3.2.5 Vorbereitung Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde vom Unternehmen Microsynth durchgeführt.

Es wurden pro Probe 15-30 µl vervielfältigte DNA eingesendet. Um dieses Volumen zu erreichen, mussten die vorliegenden Proben (je ca. 10.5 µl) verdünnt werden.

Um die DNA Konzentration der einzusendenden Proben ungefähr zu regulieren, wurde diese unterschiedlich verdünnt. Bei einer sehr starken Bande wurde 50 µl Reinstwasser zur Verdünnung zugegeben, bei einer schwächeren 20 µl (vergl. Abbildung 14). Bei der starken Verdünnung wurde 20 µl an Microsynth eingeschickt, bei der schwächeren Verdünnung die gesamte Probe (ca. 30 µl).

Die Proben wurden in eine Microsynth 96-Prepaid Platte pipettiert. Die Nummerierung wurde in eine vorformatierte Exceltabelle (Vorlage siehe Anhang I) inkl. Primer-Definition übertragen und in die Microsynth-Webseite eingelesen. Es wurden zwei Sequenzierungen angefordert (bidirektional). Die Prepaid Platte, beide Primer in 1.5 ml Eppendorf Tubes (forward und reverse), ein Gelbild und die Auftragsbestätigung (mit Nummerierung) wurden im vorgefertigten Luftpolstercouvert mitgeschickt.

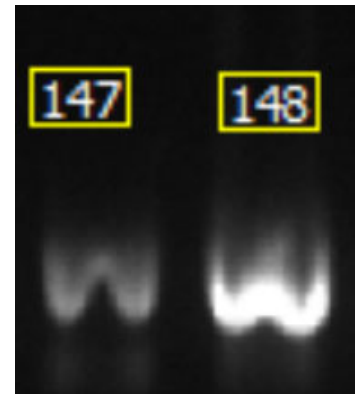
Es wurde beachtet, dass das Couvert nicht vor dem Wochenende verschickt wurde, um allfällige Lagerungen unter suboptimalen Temperaturverhältnissen zu verhindern.

Ca. 2 Tage nach Versand wurden die Sequenzierungsergebnisse von Microsynth als ZIP-Datei per E-Mail zugeschickt.

### 3.2.6 Interpretation Sequenzierungsergebnisse

Der per E-Mail erhaltenen Zip-Ordner wurden entzippt und eingesehen.

Die einzelnen Proben lagen bidirektional, also doppelt vor. Das File mit der Endung .fasta, wurde mit dem Editor geöffnet und in die Nucleotid BLAST Webseite (NCBI und NIH, Kein Datum) kopiert. Die Standardeinstellungen wurden beibehalten (Standard database, Nucleotide Collection + Highly similar sequences (megablast)).



**Abbildung 14: Beispiel Verdünnung anhand des Gelbildes: Nummer 147 = schwache Bande → 20 µl Verdünnung, ca. 30 µl an Microsynth; 148 = starke Bande → 50 µl Verdünnung, 20 µl an Microsynth.**

Als erstes wurde ermittelt, wie viele Basen analysiert wurden. Liege diese im Bereich unter 600, wurde die Datenqualität in Frage gestellt und in einem späteren Zeitraum wiederholt (ab Kapitel 3.2.1 Vorbereitung Extraktion).

Anschliessend wurden die Prozentzahlen «Query Coverage» und «Percentage Identity» des ersten Resultatvorschlags analysiert. Waren diese unter 95%, wurde evaluiert weshalb. Dafür wurde als erstes die oberste vorgeschlagene Spezies angeklickt und der Strang in der Datenbank wurde mit dem eingegebenen Strang verglichen. Resultierten die Abweichungen aufgrund von Lücken in der Sequenzierung (N's), dann wurde die .ab1 Datei aus dem Zipordner in das Programm FinchTV importiert. Über die Sequenz-Suche wurde nach «N» gesucht. Dieses wurde von Auge durch die stärkste Base (höchster Peak) ersetzt (grün=A; blau=C; schwarz=G; rot=T). Anschliessend wurde die reparierte Sequenz exportiert und erneut mittels BLAST ausgewertet.

Direkt beim Korrigieren der Sequenz im Programm FinchTV, wurde die Qualität der Sequenzierung visiert. Viele überlappende Peaks, zeigen eine schlechte Qualität auf (vergl. Abbildung 15, a)). Es kann bedeuten, dass verschiedene Species in der Probe waren, oder sonstige Verunreinigungen zur entsprechenden Sequenzierung geführt haben. Klare und einzelne Peaks deuten auf eine qualitativ gute Sequenzierung hin (vergl. Abbildung 15, b)).



**Abbildung 15: Sequenzanalyse im Programm FinchTV: a) qualitativ schlechte Sequenzierung. Peaks überlappen sich, Differenzierung schwierig. b) qualitativ gute Sequenzierung.**

War die Sequenz-Qualität gut und die Korrektur der Sequenz hat dennoch nicht zu einer Erhebung von «Query Coverage» und «Percentage Identity» auf über 95% geführt, wurde die Vertretung der Nukleotide der erstplatzierten Spezies auf BLAST verglichen. Je mehr Nukleotide zu den einzelnen Spezies in der Datenbank gespeichert sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit grössere prozentuale Übereinstimmungen der Sequenz zu erhalten (vergl. Abbildung 16). Es besteht also die Möglichkeit, dass die gesuchte Sequenz in der analysierten Form noch nicht in der BLAST Datenbank aufzufinden ist.

Alle festgestellten Fehler, sowohl die zugeordneten Arten, wurden in ein Excelfile übernommen. Anhand der Tabelle wurde entschieden, welche genetische Identifikationen wiederholt, oder welche Nematoden für die Biotests zur Ermittlung der Mortalitätsrate verwendet werden sollten.

**a) Steinernema**

Database name	Steinernema	Protein hits
Nucleotide	27'536	-
Protein	30'919	-
Protein	0	-
Protein	113	71
GEO Datasets	195	-
PubMed Central	751	713
Genbank	34	-
SIKA Experiments	351	8
Protein Chlamy	12	-
Identical Protein Groups	36,527	-
Protein	25	1
Protein	341	-
Protein	8	-
Protein	2	-
Protein	242	1

**b) Oscheius**

Database name	Oscheius	Protein hits
Nucleotide	312	-
Protein	25	-
Protein	37	33
GEO Datasets	3	-
PubMed Central	167	166
Genbank	127	-
SIKA Experiments	47	-
Protein Chlamy	12	-
Identical Protein Groups	127	-
Protein	4	-
Protein	96	1

**Abbildung 16: Vergleich Vertretung Nukleotide (rote Rahmen) von verschiedenen Organismen in der BLAST Datenbank. a) *Steinernema* (NCBI, kein Datum b): 27'536 Nukleotide --> oft vertreten, grössere Wahrscheinlichkeit auf prozentuale Übereinstimmungen; b) *Oscheius* (NCBI, kein Datum a): 312 Nukleotide --> selten vertreten, kleinere Wahrscheinlichkeit auf prozentuale Übereinstimmungen.**

### 3.3 Anfertigung einer GIS-Karte

Für die Anfertigung der GIS (Geoinformationssystem) Karte wurde als Basis Basemap die Karte «Imagery» gewählt. Zur Strukturierung der Schweizer Karte, wurden zusätzlich die Layer «Hybrid references» zur Beschriftung der Kantone sowohl einiger Punkte nationaler Bedeutung, «Switzerland Kantone Boundaries» und «2020 Boundaries Switzerland» je zur Visualisierung der Kantons- und Landesgrenzen gewählt. Alle Layer wurden direkt von ArcGIS heruntergeladen und sind von ESRI Inc. (Environmental Systems Research Institute) erstellt worden.

Zur Visualisierung der Probestandorte sowohl der gefundenen Nematoden wurden einzelne Vektor-Datensets erfasst. Alle Datensets erhielten ein eigenes Symbol.

Um die Standorte zu lokalisieren, wurden über «Menüband Map > Go To XY» die bei der Beprobung vor Ort erfassten Koordinaten gesucht. Anschliessend wurden über «Menüband Edit > Create new Attribute» die gewünschten Vektor-Datensets platziert.

Es wurden zwei Karten angefertigt. Eine nur mit Probeorten, die andere zusätzlich mit den gefundenen Nematoden. Die erste Karte wurde schweizweit, die zweite aufgrund der Übersichtlichkeit nur im Raum Wallis exportiert.

Vor dem Karten-Export wurden die gewünschten Vektor-Datensets im Contents Pane aktiviert, über «Menüband Insert > New Layout > A3 (Querformat) > Map Frame» wurde die Karte positioniert und Titel, Quelle, Nordpfeil, Massstabelle, Massstabtext sowohl die Legende wurden über das Menüband Insert eingefügt. Die Karten wurden über «Menüband Share > Layout» als PDF abgespeichert.

Die vollständige ArcGIS Karte (.aprx Datei) befindet sich im Abgabeumfang dieser Masterarbeit und lässt sich bei Bedarf verändern oder erweitern.

### 3.4 Biotests zur Ermittlung der Mortalität von *Cetoniinae* Larven unter Einfluss von entomopathogener Nematoden

Zur Ermittlung der Mortalitätsrate der entomopathogenen Nematoden, wurde ein zweistufiger Biotest entwickelt, welcher in den kommenden Kapiteln erörtert wird.

Die in den Biotests untersuchten Organismen wurden zu diesem Zeitpunkt noch nicht molekularbiologisch identifiziert, womit auch ungewollt Saprobionten getestet wurden. In den kommenden Kapiteln ist jeweils dennoch die Rede von «Nematoden».

Zur Vorbereitung der Biotests wurden die Petrischalen mit der Nematodensuspension mittels Zählschale (vergl. Abbildung 17) ausgezählt. Dafür wurde je 0.25 ml homogenisierte Nematodensuspension in die Mitte der Zählschale pipettiert, geschwenkt und mit dem Binocular und Handzähler komplett ausgezählt. Die Zählung wurde insgesamt 4 Mal wiederholt und auf die Anzahl Nematoden/ml aufgerechnet.



**Abbildung 17: Zählschale für Nematoden.**

Aufgrund nicht verfügbarer *P. japonica* Larven (Corona-Pandemie), wurden als Alternative *Cetoniinae* Larven für die Biotests genutzt.

Diese sind systematisch ähnlich wie *P. japonica* Larven sind und waren verfügbar. Die *Cetoniinae* Larven wurden aus einem privaten Kompost gesammelt und bis zu den Versuchen im Kompost-Substrat bei 4°C aufbewahrt. Zukünftig sollen im Versuchsverfahren die *Cetoniinae* Larven durch *P. japonica* Larven ersetzt werden.

#### 3.4.1 Biotest Stufe 1

Im Biotest Stufe 1 wurden die Nematoden direkt auf den Larven ausgebracht, um einen direkten Befall, sowie die eintretende Mortalität zu messen.

Für jede zu testende Nematodenart wurden drei *Cetoniinae* Larven in sechser Gewebekulturplatten inkl. einem mit destilliertem Wasser angefeuchteten Filterpapier als Untergrund, vorbereitet. Auf jede Larve wurde mit einer Pipette 100 Nematodensuspension geträufelt. Die Maximalmenge an Wasser wurde auf 1 ml definiert, um eine Mortalität durch stehendes Wasser auszuschliessen. Abweichende Nematodenzahlen wurden notiert. Es wurden 18 Kontroll-Larven, mit je 1 ml destilliertem Wasser beträufelt (vergl. Abbildung 18).



**Abbildung 18: Gewebekulturplatten mit behandelten Larven nach einer Woche Inkubation.**



Anschliessend wurden die Gewebekulturplatten mit Deckel und Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit wurde mit einem Temperaturlogger festgehalten.

Der Versuch wurde zwischen dem 21.04.2020 und dem 11.05.2020 während 21 Tagen täglich bis alle zwei Tage kontrolliert und in einem Excelfile dokumentiert. Die Daten wurden mit dem Statistikprogramm R in Form eines Säulendiagramms visualisiert. Die Resultate wurden aufgrund der kleinen Anzahl Wiederholungen (statistisch nicht Aussagekräftig) nur deskriptiv beschrieben.

Nach Abschluss der Versuche, wurden die Gewebekulturplatten zur Abtötung der Organismen bei -20°C während 48h eingefroren und anschliessend über die Kehrlichtverbrennung entsorgt.

### 3.4.2 Biotest Stufe 2

Eine Auswahl von 6 Nematoden welche in der ersten Biotest Stufe eine erhöhte Mortalitätsrate im Vergleich zur Kontrolle aufgewiesen haben, wurden in den Biotest Stufe 2 übernommen.



**Abbildung 19: Topf mit Substrat und mittig platzierter Larve.**

Es wurden pro Nematode 6 *Cetoniidae* Larven verwendet. Davon wurden 5 Larven einzeln in mit Biohum Substrat gefüllte 13 cm Töpfe (ca. 1l), ungefähr mittig positioniert (vergl. Abbildung 19). Je eine weitere Larve pro zu testende Nematodenart wurde in einem mit Biohum Substrat gefüllten 50 ml Falcon Tube ebenfalls mittig positioniert. Alle Töpfe und Tubes wurden mit Leitungswasser angefeuchtet (kein stehendes Wasser) und anschliessend mit je 50 Nematoden beträufelt. Es wurden 12 Kontrolltöpfe, sowohl ein Kontroll-Falcon Tube mit ausschliesslich *Cetoniidae* Larven und Bewässerung mitgeführt.

Die Töpfe wurden gemischt in Plastikwannen gelagert, welche mit einem 60-90 µm Netz (SEFAR S-TEX, PA 60-80) verschlossen wurden (vergl. Abbildung 20). Der Versuch wurde bei Raumtemperatur unter normalen Lichtverhältnissen (am geschlossenen Fenster) durchgeführt. Die Temperatur sowohl die Luftfeuchtigkeit wurde mit einem Temperaturlogger dokumentiert.

Die Substratfeuchtigkeit wurde während des zweiwöchigen Versuchs alle 3-4 Tage (abhängig von Sonnenstrahlung und Temperatur) kontrolliert und bei Bedarf bewässert.

Nach zwei Wochen wurden die Töpfe und Falcontubes in einer Plastikwanne ausgekippt. In einem Excelfile wurde dokumentiert, ob die *Cetoniidae* Larven tot oder lebendig aufgefunden wurden. Die Daten wurden mit dem Statistikprogramm R in Form eines Säulendiagramms visualisiert. Die Resultate wurden aufgrund der kleinen Anzahl Wiederholungen (statistisch nicht Aussagekräftig) nur deskriptiv beschrieben.

Das Substrat wurde über die Kehrlichtverbrennung entsorgt, die Töpfe und Netze wurden während 48h bei -20°C tiefgefroren und anschliessend von Hand zur Wiederverwendung gewaschen.



**Abbildung 20: Biotest Stufe 2. Töpfe und Falcontubes in Plastikwanne, verschlossen mit Netz.**



## 4 Resultate

### 4.1 Sammlung Bodenproben

Während der Zeitperiode von Oktober bis Dezember 2019 wurden an 25 Standorten insgesamt 69 Mischproben gesammelt und in 207 Töpfen mit je 8 *Galleria mellonella* Larven inkubiert. Aus diesen konnten 153 mit nematodenähnlichen Organismen infizierte *G. mellonella* Larven gewonnen werden.

Die nachfolgende Tabelle 4 zeigt die Standorte, deren zugehörige Anzahl Mischproben und die Anzahl daraus infizierten *G. mellonella* Larven.

**Tabelle 4: Standorte Probeentnahme und deren Erfolgsbilanz in Form von infizierten *Galleria mellonella* Larven.**

Standort-nummer	Datum Beprobung	Standortbezeichnung	X Koordinate	Y Koordinate	Anzahl Mischproben	Anzahl Infizierte Galleria
1	28.10.2019	Zürich, Grüental	47.2175	8.681667	5	5
2	27.11.2019	Wallis, Ricola	46.567778	7.1525	5	10
3	27.11.2019	Wallis, Stade	46.235556	7.395833	2	5
4	27.11.2019	Wallis, Stephan	46.245278	7.395278	4	13
5	28.11.2019	Zürich, Au	47.2475	8.649444	2	4
6	28.11.2019	Zürich, Nuolen	47.201302	8.899775	2	4
7	05.12.2019	Tessin, Stabio	45.838889	8.913333	4	11
8	05.12.2019	Tessin, Malvaja	46.391944	8.980833	2	0
9	05.12.2019	Tessin, Cadenazzo Gud	46.167222	8.94	4	2
10	05.12.2019	Tessin, Stabio Wine	45.844444	8.922778	4	3
11	05.12.2019	Tessin, Semione	46.406111	8.975	4	7
12	05.12.2019	Tessin, Semione 2	46.426667	8.973889	2	5
13	05.12.2019	Tessin, Gordola	46.186111	8.855556	2	12
14	05.12.2019	Tessin, Novazzano	45.843611	8.965278	4	5
15	05.12.2019	Tessin, Novazzano 2	45.836667	9.002778	3	5
16	02.12.2019	Uri, Rusli	46.782778	8.671667	2	10
17	02.12.2019	Uri, Rega	46.832778	8.639444	1	1
18	02.12.2019	Uri, Attinghausen	46.856667	8.632778	1	0
19	02.12.2019	Uri, Frentschenberg	46.773333	8.681944	2	3
20	02.12.2019	Uri, Hof	46.7875	8.671389	2	8
21	02.12.2019	Uri, Vogelholz	46.785	8.673056	2	14
22	02.12.2019	Uri, Unterschächen	46.863889	8.771111	2	3
23	02.12.2019	Uri, Schächenmatt	46.867222	8.640833	2	9
24	27.11.2019	Wallis, Brasil	46.243889	7.385833	3	8
25	27.11.2019	Wallis, Glaré	46.237778	7.3925	3	6

## **4.2 Sequenzierte DNA aus extrahierten Nematoden**

Die während der Zeitperiode von Oktober bis Dezember 2019 extrahierten nematodenähnlichen Organismen wurden, wenn möglich, mittels Reinfektionen in eine reinere Form gebracht (vergl. Rohdaten-Tabelle Anhang G). Die direkt aus den Bodenproben extrahierten (153 Stück), sowohl die aus den Reinfektionen gewonnenen (71 Stück) nematodenähnlichen Organismen, wurden mittels PCR analysiert.

Die 178 Proben mit Banden in den Gel-Bildern (vergl. Anhang H), wurden zur Sequenzierung an Microsynth gesendet. Aus den Sequenzierungen konnten durch BLAST 106 Proben entomopathogenen Nematoden zugeordnet werden.

In der Tabelle 5 wurden die Sequenzierungen welche keine Resultate oder andere Organismen als entomopathogene Nematoden hervorgebracht haben, als «NA» gekennzeichnet. Es wurde dokumentiert, ob ein unsicheres Resultat (weniger als 700 Basen aus Sequenzierung hervorgegangen oder percent identity in BLAST unter 95%) vorliegt und die Interpretation dazu notiert.

**Tabelle 5: Resultate Sequenzierung nematodenähnliche Organismen, inkl. Fehlerinterpretation.**

Probennummer	Nematode fw-Primer (BLAST)	Nematode rw-Primer (BLAST)	fw unter 95% percent identity [%]	fw unter 700 Basen	rv unter 95% percent identity [%]	rv unter 700 Basen	Kommentar
1	NA	Oscheius sp.		146			rw) Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
2	NA	NA					
3	Diplogasteroides sp.	NA		618			fw) Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
4	NA	NA					
5	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
6	Steinernema carpocapsae	Steinernema carpocapsae					
7	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae		292		486	Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
8	Cruznema sp.	Steinernema feltiae					
9	Oscheius sp.	Oscheius sp.					
10	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
11	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
12	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
13	NA	NA					
14	Oscheius sp.	Oscheius sp.					
15	NA	NA					
16	NA	Diplogasteroides sp.			87		rw) schwach vertreten (87 Nukleotide) auf NCBI Blast
17	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae		543			Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
18	Oscheius sp.	Oscheius sp.					
19	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae		280			fw) Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
20	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae	93			455	fw) überlappende Peaks, unreine Probe; rw) Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
21	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
22	Steinernema feltiae	NA					
23	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
24	Oscheius myriophilus	Oscheius myriophilus					
25	Oscheius sp.	Oscheius sp.			94		rw) Überlappende Peaks, unreine Probe
26	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
27	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
28	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
29	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae			90		rw) Überlappende Peaks, unreine Probe
30	Oscheius tipulae	Oscheius tipulae					
31	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae			87		rw) Überlappende Peaks, unreine Probe
35	Oscheius tipulae	Oscheius tipulae					
36	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
37	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
38	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
42	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
43	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
44	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
45	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
46	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
47	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
48	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
49	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
50	Oscheius sp.	Oscheius sp.	94				fw) schwach vertreten (312 Nukleotide) auf NCBI Blast
51	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
52	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
53	Cruznema sp.	Cruznema sp.					
54	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
55	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
56	Oscheius myriophilus	Oscheius myriophilus					
57	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
58	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
60	Oscheius myriophilus	Oscheius myriophilus					

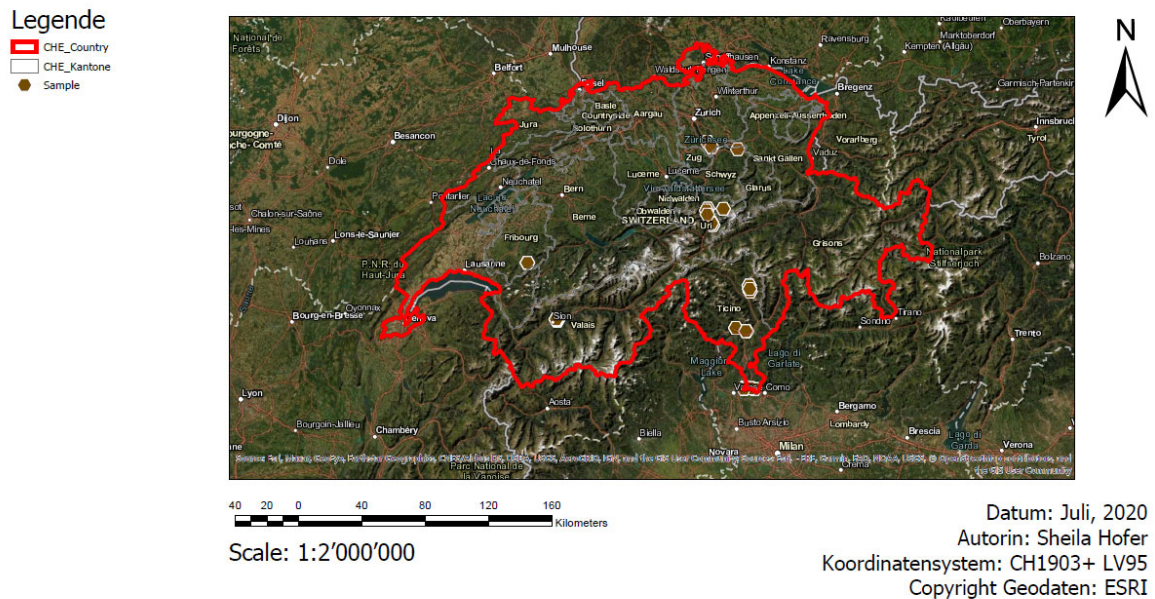
Proben-nummer	Nematode fw-Primer (BLAST)	Nematode rw-Primer (BLAST)	fw unter 95% percent identity [%]	fw unter 700 Basen	rv unter 95% percent identity [%]	rv unter 700 Basen	Kommentar
61	Tylopharynx foetidus	Diplogasteroides sp.		194	88		fw) Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung; verschiedene Spezies möglich; rv) schwach vertreten (87 Nukleotide) auf NCBI Blast
62	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
63	Oscheius sp.	Oscheius sp.					
64	NA	NA					
65	NA	NA					
66	NA	Diplogasteroides sp.			82		rw) schwach vertreten (87 Nukleotide) auf NCBI Blast
67	NA	NA					
68	NA	NA					
69	NA	NA					
71	NA	NA					
72	NA	NA					
73	Oscheius sp.	Oscheius sp.					
74	NA	NA					
75	NA	NA					
76	NA	NA					
77	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae			94		rw) Schwach überlappende Peaks, unreine Probe
78	Oscheius sp.	Oscheius sp.					
79	Pristionchus sp	Pristionchus entomophagus		284		77	Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
80	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
82	NA	NA					
83	Steinernema feltiae	NA					
84	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
85	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
86	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
87	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
91	NA	NA					
93	NA	NA					
94	Pristionchus sp	Pristionchus sp					
98	NA	NA					
99	NA	NA					
101	NA	NA					
102	NA	NA					
103	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
104	NA	NA					
105	NA	NA					
107	NA	NA					
108	NA	NA					
109	NA	NA					
111	NA	NA					
112	NA	NA					
113	NA	NA					
114	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
115	NA	NA					
116	NA	NA					
118	NA	NA					
119	NA	NA					
120	NA	NA					
121	NA	NA					
122	NA	NA					
123	NA	NA					
124	NA	NA					
125	NA	NA					
126	NA	NA					
127	NA	NA					
128	NA	NA					
129	NA	NA					
130	NA	NA					
131	NA	NA					
132	NA	NA					
133	NA	NA					
134	NA	NA					

Proben-nummer	Nematode fw-Primer (BLAST)	Nematode rw-Primer (BLAST)	fw unter 95% percent identity [%]	fw unter 700 Basen	rv unter 95% percent identity [%]	rv unter 700 Basen	Kommentar
136	NA	Pristionchus sp.				244	rw) Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
137	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
138	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
143	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
145	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
146	NA	NA					
147	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae		496			fw) Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
148	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
149	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
152	NA	NA					
153	NA	NA					
154	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
158	Pristionchus sp.	Pristionchus entomophagus				86	rw) Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
160	Cruznema sp.	Cruznema sp.					
161	NA	NA					
162	Oscheius sp.	Oscheius sp.		91		28	Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
163	Cruznema sp.	Cruznema sp.					
164	NA	Cruznema sp.				443	rw) Vermutlich Fehler bei DNA-Aufreinigung
165	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
166	Cruznema sp.	Cruznema sp.					
167	Cruznema sp.	Cruznema sp.					
169	Pristionchus sp.	Pristionchus sp.					
170	Cruznema sp.	Cruznema sp.					
171	NA	NA					
172	NA	NA					
173	NA	NA					
174	Diplogasteroides sp.	Diplogasteroides sp.	81		81		fw) überlappende Peaks, unreine Probe; rw) schwach vertreten (87 Nukleotide) auf NCBI Blast
175	NA	NA					
176	NA	NA					
177	Oscheius sp.	Oscheius sp.					
178	NA	NA					
179	NA	NA					
181	NA	NA					
183	NA	NA					
184	Oscheius sp.	Oscheius sp.	86				fw) überlappende Peaks, unreine Probe
185	NA	NA					
188	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
189	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae	86		87		Überlappende Peaks, unreine Proben
190	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae	88		89		Überlappende Peaks, unreine Proben
191	NA	NA					
193	NA	NA					
194	NA	NA					
198	NA	NA					
199	NA	NA					
200	Oscheius sp.	Oscheius sp.					
201	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
202	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
203	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae	90		94		Überlappende Peaks, unreine Proben
204	Pristionchus sp.	Pristionchus sp.			82		rw) Überlappende Peaks, unreine Probe
208	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
209	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae	90		93		Überlappende Peaks, unreine Proben
210	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae					
211	Diplogasteroides sp.	Diplogasteroides sp.	84		83		Überlappende Peaks, unreine Proben
212	Pristionchus entomophagus	Pristionchus entomophagus					
213	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae	93		93		Schwach überlappende Peaks, unreine Proben
214	Apiotrichum laibachii	Apiotrichum laibachii					
215	NA	NA					
216	NA	NA					
217	Gastrostyla steinii	Gastrostyla steinii					
219	NA	NA					
221	NA	NA					
222	NA	NA					
226	Oscheius sp.	Oscheius sp.	92		89		Überlappende Peaks, unreine Proben
227	Oscheius sp.	Oscheius sp.					

### 4.3 ArcGIS-Karte

In folgender ArcGIS-Karte (Abbildung 21) sind alle 69 Mischprobe-Standorte (Kanton Wallis, Tessin, Zürich, Uri und Schwyz), aus der Sammelperiode von Oktober bis Dezember 2019, dargestellt.

## Probenamestandorte Schweiz

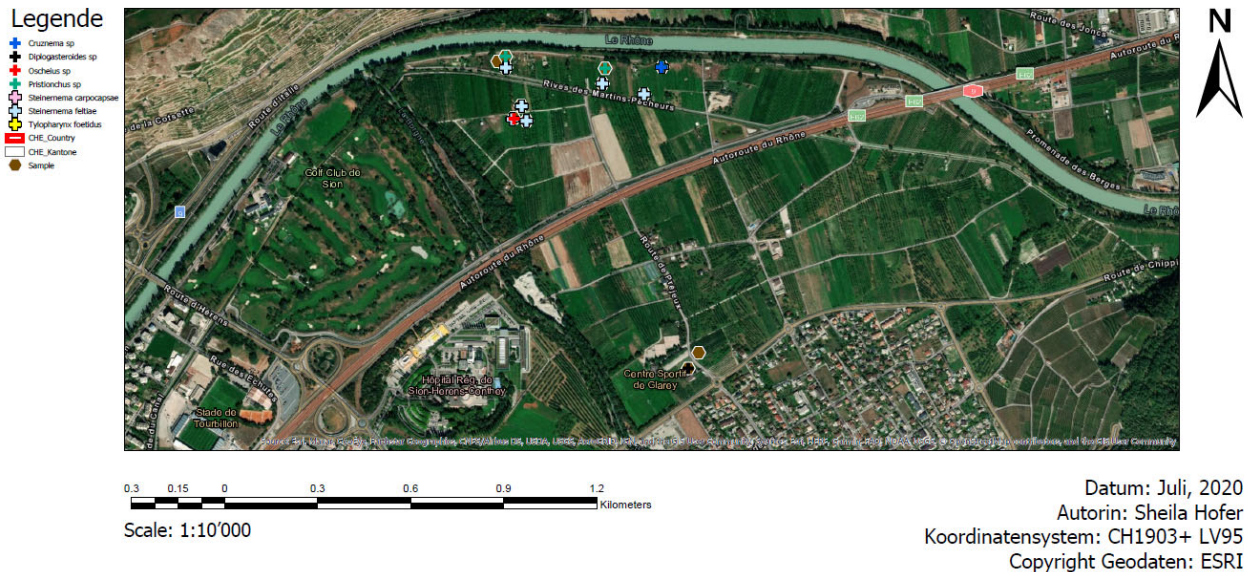


**Abbildung 21: ArcGIS Karte mit allen Bodenproben-Standorten (braunes Polygon) in der Schweiz. Sammelperiode Herbst-Winter 2019.**

In der nächsten ArcGIS-Karte (Abbildung 22) wurde der Übersichtlichkeit halber (Überlappungen bei entferntem Zoom) nur der Kartenabschnitt Wallis dargestellt. Man erkennt die Probestandorte und die vor Ort gefundenen Nematoden, welche mittels Sequenzierung identifiziert wurden. Die restlichen Kartenabschnitte lassen sich der .aprx Datei im Abgabe-Umfang dieser Masterarbeit entnehmen.

Insgesamt wurden an den 69 Mischprobe-Standorten 47 verschiedene entomopathogene Nematodenarten gefunden. Ist eine Nematodenart in einer Mischprobe doppelt vorgekommen, wurde diese lediglich einfach gezählt. Wurde die gleiche Nematodenart in zwei verschiedenen Mischproben identifiziert, erfolgte die Zählung zweifach. Total wurden sieben verschiedene entomopathogene Nematodenarten gefunden und extrahiert

## Probenamestandorte inkl. isolierter Nematoden am Beispiel Wallis



**Abbildung 22: ArcGIS Karte mit Nematoden-Fundorte (farbige Kreuze) am Beispiel Wallis. Sammel-periode Herbst-Winter 2019.**

### 4.4 Biotests

#### 4.4.1 Biotest Stufe 1

Weil der Biotest Stufe 1 in einem Wohnmöbel inkubiert wurde, wo die Temperatur und Luftfeuchtigkeit nicht gesteuert werden konnte, erfolgte die Temperaturmessung mittels einem Temperaturlogger. Die Temperaturschwankung lag zwischen 21.5°C und 24.5°C. Die Luftfeuchtigkeit schwankte zwischen 25% und 48.5%. Das detaillierte Diagramm befindet sich im Anhang J.

Die Proben wurden zufällig gewählt, da die genetische Identifikation aufgrund von der Coronapandemie zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt werden konnte.

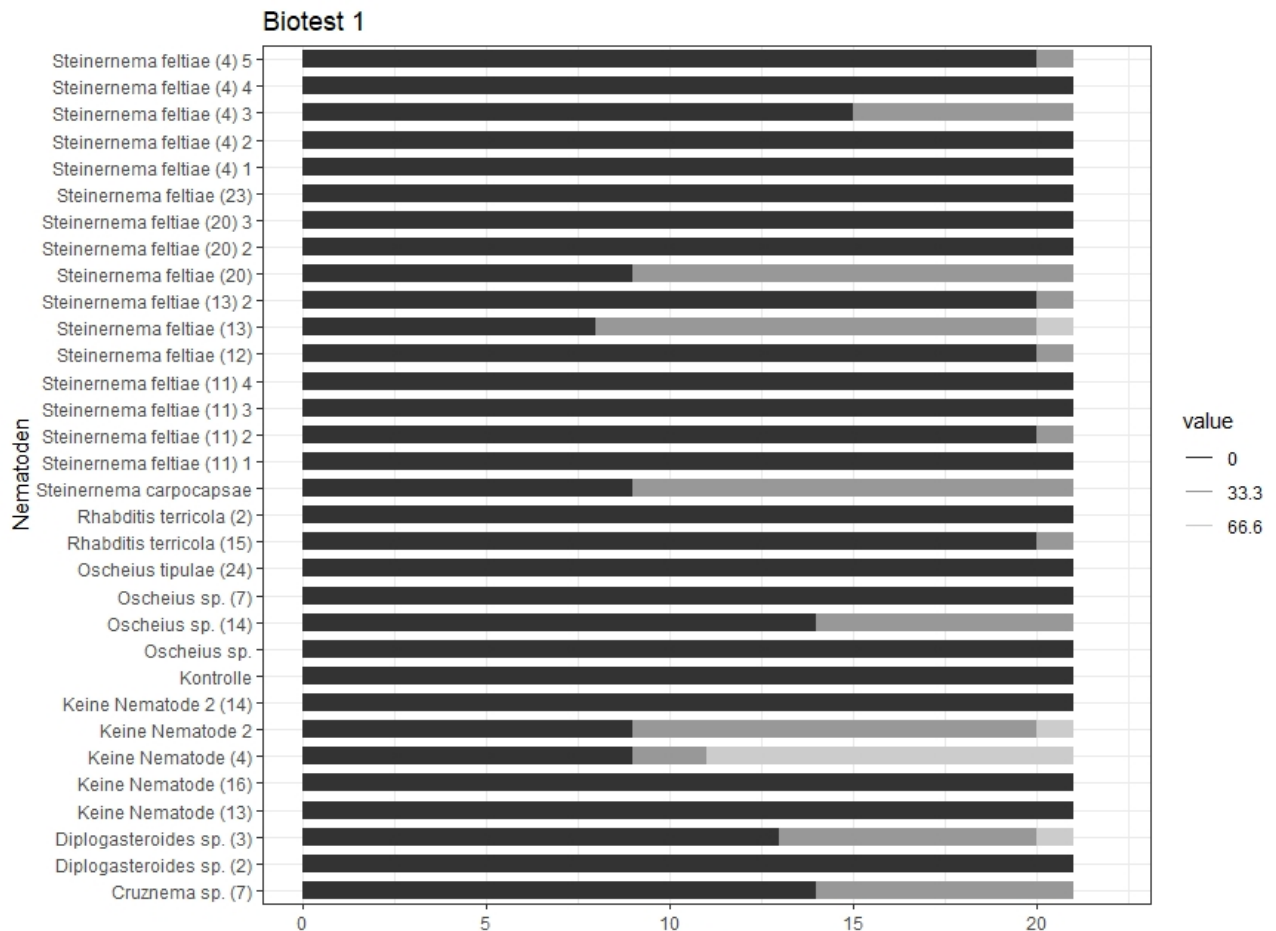
Der Biotest 1 wurde mittels R-Studio visualisiert (R-Code vergl. Anhang K) (vergl. Abbildung 23). Die y-Achse listet alle getesteten Nematoden. Die nebenstehende Zahl in den Klammern bezieht sich auf den Standort, wo die Nematoden gefunden wurden (vergl. Tabelle 4). Die Zeilen «Keine Nematode» wurde in einem späteren Zeitraum als ein anderer Organismus identifiziert – wie z.B. ein Saprobiont – und kann somit in der Auswertung ignoriert werden. Die x-Achse definiert die Anzahl Tage, nach welchen die *Cetoniidae* Larven gestorben sind. Die Mortalität wurde prozentual dargestellt. Die behandelten Larven wurden jeweils dreifach wiederholt. Die Kontrolle wurde 18-fach wiederholt. Die dazugehörigen Rohdaten befinden sich im Anhang L.

Der Chi-Quadrat-Test konnte aufgrund der zu kleinen Anzahl Wiederholungen pro Durchgang, nicht durchgeführt werden. Deshalb werden die Resultate nur deskriptiv ausgewertet:



Die Kontrolle wies während der 21 Versuchstage keine Mortalität bei den *Cetoniidae* Larven auf. *Steinernema feltiae* (13) wies nach 8 Tagen eine 33.3% Mortalität auf. *Steinernema feltiae* (20) und *Steinernema carpocapsae* (16) ebenfalls eine 33.3% Mortalität nach 9 Tagen.

Anderen Nematoden wiesen erst später eine Mortalität auf, womit ein natürlicher Tod der Larven nicht ausgeschlossen werden kann und somit nicht als Tod durch Einfluss von Nematoden gewertet wird.



**Abbildung 23: Biotest 1, R-Balkendiagramm zur Visualisierung der zeitabhängigen Mortalität der *Cetoniidae* Larven nach der Applikation verschiedener Nematoden.**

#### 4.4.2 Biotest Stufe 2

Der Biotest Stufe 2 wurde ebenfalls mit einem Temperaturlogger beobachtet, da dieser auf einer Ablagefläche vor einem Fenster durchgeführt wurde, wo die Temperatur und Luftfeuchtigkeit nicht gesteuert werden konnte. Die Temperaturen schwankten zwischen 21.5°C und 26°C. Den Temperaturextremen wurde mit Bewässerungen entgegengewirkt. Die Luftfeuchtigkeit lag zwischen 38% und 68.5%. Die dazugehörigen Rohdaten befinden sich im Anhang L.

Für den Biotest Stufe 2 wurden Organismen gewählt, welche im Biotest Stufe 1 eine erhöhte Larven-Mortalität aufgewiesen haben.

Nach einer 14-Tägigen Inkubationszeit wurde die Mortalität der *Cetoniidae* Larven ausgewertet.



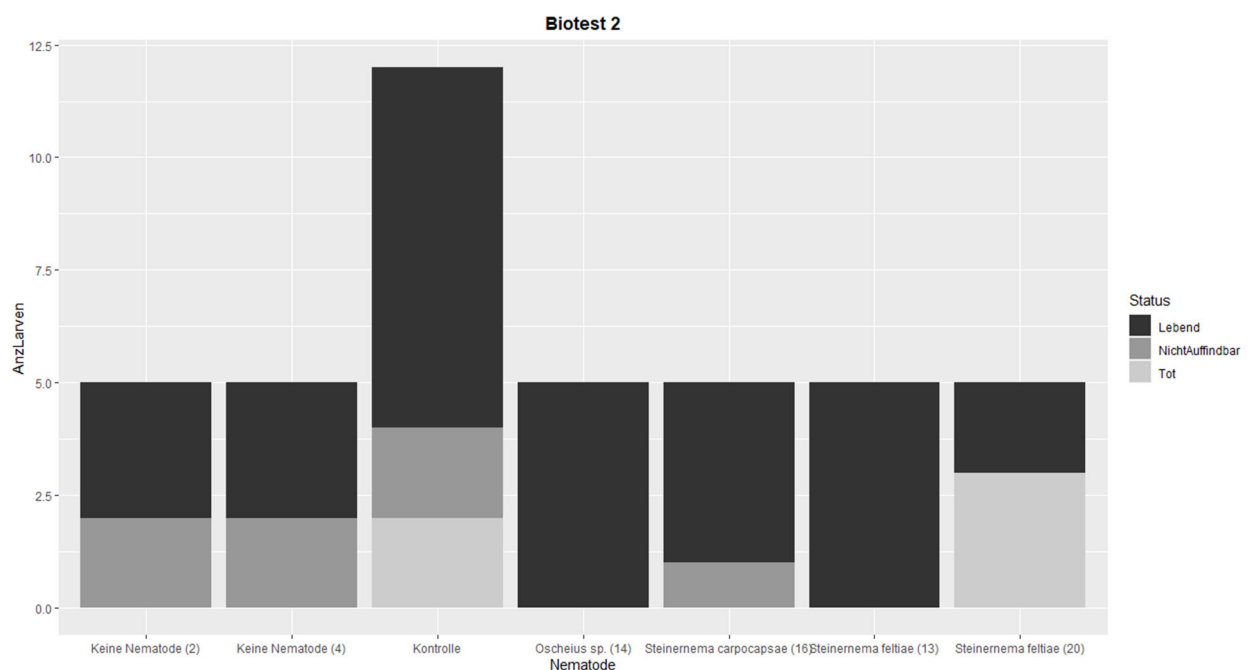
Keine Larven aus den Falcon Tubes haben überlebt. Sowohl die Kontrolle als auch die behandelten Larven wurden tot aufgefunden. Deshalb wurde keine visuelle Auswertung zu diesem Nebenversuch angefertigt.

Die nachfolgende Abbildung 24 wurde mittels R-Studio visualisiert (R-Code vergl. Anhang K). Auf der x-Achse sind die getesteten Nematoden dargestellt. Die Anzahl getesteter *Cetoniidae* Larven (y-Achse) war pro Nematodenart 5, in der Kontrolle 12.

Aufgrund der geringen Anzahl Wiederholungen und der unbekannten Variabel (nicht auffindbare Larven), wurde kein  $\chi^2$ -Test durchgeführt und der Versuch wurde nur deskriptiv ausgewertet:

Insgesamt konnten 7 Larven nicht mehr aufgefunden werden. Zwei davon in der Kontrolle. Sie wurden weder im Topf noch in der umliegenden Auffangschale aufgefunden. Es ist unklar, ob die Larven verendet und verrottet sind, sie übersehen wurden oder ob sie unbemerkt geflüchtet sind. Es gab insgesamt 5 tote Larven nach 14 Tagen. 2 (17%) davon in der Kontrolle, 3 (60%) durch den Einsatz von *Steinernema feltiae* (20).

Die erhöhte Mortalität bei *Steinernema feltiae* (20) deckt sich mit den Resultaten im Biotest 1.



**Abbildung 24: Biotest 2, R Balkendiagramm zur Visualisierung der Mortalität der Larven nach der Applikation verschiedener Nematoden in Töpfen mit Substrat.**

## **5 Diskussion**

### **5.1 Nematodenextraktion**

#### **5.1.1 Sammlung Nematoden**

Allgemein ist festzustellen, dass die Anzahl extrahierter Nematoden im Verhältnis zu den Probezahlen in Erfahrung früherer Projekte akzeptabel ist (persönliche Mitteilung, J. Grunder, 2020). Generell wäre es für das Japankäferprojekt aber spannend, die Bodenproben geographisch auszuweiten. Dabei sollte beachtet werden, dass verschiedene klimatische Gebiete und Bodenbeschaffenheiten beprobt werden, um die Wahrscheinlichkeit der zu findenden entomopathogenen Nematoden zu erhöhen.

Die ArcGIS-Karte hat gezeigt, dass das Auftreten unterschiedlicher entomopathogener Nematodenarten nicht zwingend abhängig von spezifischen Strukturen ist, wie z.B. an Waldrändern. Deshalb ist es wichtig, so viele Proben wie möglich zu sammeln und zu verarbeiten, damit für die Biotests mehr Nematoden zur Verfügung stehen.

Die zukünftige Sammlung der Nematoden kann nun im Arc-GIS Dokument mit überschaubarem Aufwand eingetragen werden, um eine gesamte Übersicht und eine Basis zur Modellierung zu erhalten.

Die Fragestellung «Eine Geoinformationssystem-Karte stellt die Probestandorte, sowohl die gefundenen entomopathogenen Nematoden grafisch dar.» konnte somit bestätigt werden.

#### **5.1.2 Isolation Nematoden**

Um die Anzahl Proben zu verringern, welche mit nematodenähnlichen Saprobionten verunreinigt sind, sollten die *Galleria mellonella* Larven aus den Töpfen vor der Inkubation, mit Wasser abgespritzt werden, bevor sie auf die Filterpapiere platziert werden. Dies sollte mindestens die Saprobionten reduzieren, welche es nicht in ihren Wirtsorganismus geschafft haben (Taboga, 1981).

Auch könnte durch das Verwenden von verschiedenen Klimaschränken, für die Inkubation der Bodenproben und der Petrischalen zur Nematodenextraktion, eine Kreuzkontamination von beispielsweise Milben reduziert werden.

Beobachtungen während der Versuche haben gezeigt, dass die Inkubationszeiten generell ziemlich grosszügig festgelegt wurden. Die mit *G. mellonella* angereicherten Töpfe könnten beispielsweise statt nach 7, bereits nach 5 Tagen ausgewertet werden. Gleiches gilt bei der Erstkontrolle der Reinfektionen. Diese kann anstelle von 5 bereits nach 3-4 Tagen durchgeführt werden (wie es z.B. in der Methodensammlung von McMullen und Stock (2014) durchgeführt wird). Bei der Reinfektion muss im Gegensatz zu der Infektion in den Töpfen keine zusätzliche Substrat-Hürde überwunden werden, weshalb die Nematoden in der Theorie die Larven schneller penetrieren

und abtöten sollten. Je früher die toten Larven gefunden werden, desto einfacher ist die Reinigung mit Wasser, da der Verwesungsprozess noch nicht weit fortgeschritten ist. Ebenfalls ist die Wahrscheinlichkeit kleiner, dass bereits ein zusätzlicher Befall, durch z.B. Pilzen, stattgefunden hat.

Eine frühere Weiterverarbeitung der ausgeschwärmten Nematoden, sollte ebenfalls möglich sein. Hierbei müssten während der Inkubation Kontrollgänge all zwei bis drei Tage eingeplant werden, anstatt wie bis anhin nur am Ende der Inkubationszeit. So kann festgestellt werden, ab welchem Zeitpunkt die meisten Nematoden den Wirt verlassen haben, um eine effiziente Ernte zu gewährleisten. Je früher man die Nematoden erntet, desto schneller können diese in den Kühlschrank verlegt werden, womit sie längere Zeit haltbar bleiben. Zudem wird die Wahrscheinlichkeit von zwischenzeitlichen Kontaminationen durch andere Organismen reduziert.

## **5.2 Identifikation Nematoden**

Während der Versuche für diese Masterarbeit waren vor Ort keine Positivkontrollen verfügbar und hätten extra bestellt werden müssen. Die Nutzung bereits positiv ausgefallener Proben aus vergangenen Versuchen, wurde nicht in Betracht gezogen. Für eine wissenschaftlichere Handhabung und einer Vereinfachung der Lösungsfindung bei fraglichen Resultaten, ist es sehr wichtig, zukünftig Positivkontrollen miteinzubinden. Hierfür kann zum Beispiel eine bereits positiv getestete Probe, oder ein kommerziell erworbenes Nematodenprodukt verwendet werden.

Als Hürde während der Versuche, stellte sich heraus, dass nach nur wenigen PCR-Durchläufen begann die Negativkontrolle schwach positiv auszufallen. Es wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um diverse Einflüsse auszuschliessen. So konnte definiert werden, dass es sich beim schwach positiven Resultat mit ziemlicher Sicherheit um Aerosole handelt, welche die Proben beeinflussen. Beim Arbeiten in einer Kapelle, konnte die Negativkontrolle wieder negativ gehalten werden.

Optimal wäre es, wenn alle Arbeiten nach der PCR räumlich getrennt von der DNA-Extraktion stattfinden könnten, um Aerosol-Kontaminationen zu verhindern. Da dies in den ZHAW-Räumlichkeiten jedoch nicht möglich ist, kann stattdessen die Pipettierarbeit bis hin zur PCR in Kapellen durchgeführt werden.

Die schwach positive Negativkontrolle wurde sequenziert. Mittels BLAST konnte festgestellt werden, dass ein Saprobiont (*Rhabditis terricola*) nachgewiesen wurde. Insofern sind anderen Resultate derzeit noch nicht durch eine fälschliche positive Reaktion beeinflusst, da nur nach entomopathogenen Nematoden gesucht wird. Es sollte dennoch versucht werden, die Aerosole auf ein Minimum zu reduzieren und keine neue Kontaminationen zuzulassen. Weitere positive Negativkontrollen sollen regelmässig sequenziert werden, um eine Kontamination durch entomopathogene Nematoden auszuschliessen.

Resultate welche weniger als 700 Basen in der Sequenzierung oder überlappende Peaks in der Auswertung aufgewiesen haben, sollten erneut extrahiert werden. Falls sich die überlappenden Peaks wiederholen, ist davon auszugehen, dass mehrere Organismen in der Probe vorzufinden sind. Diese könnte mittels einer weiteren Reinfektion gesäubert werden.

Nematoden mit einem schlechten Resultat, welches mit der geringen Anzahl an erfassten Nucleotide auf BLAST in Zusammenhang gebracht wurden, müssen nicht wiederholt werden.

Die Hypothese «Es werden mittels schweizweit gesammelter Bodenproben verschiedene entomopathogene Nematodenarten extrahiert, in Zucht genommen und molekularbiologisch identifiziert.», konnte bestätigt werden.

### **5.3 Biotests**

Die Versuche mit den *P. japonica* Larven werden zukünftig in einem Quarantäneraum durchgeführt. Deshalb wird die Versuchsanordnung inkl. Entsorgung zukünftig den entsprechenden Quarantänerichtlinien angepasst. Die Diskussion in den folgenden zwei Kapitel beziehen sich nur auf die entwickelte Versuchsanordnung mit nicht-Quarantäneorganismen.

Es gilt zu beachten, dass das Ziel dieser Masterarbeit war, die Versuchsanordnung der Biotests zu entwickeln. Der Fokus wurde deshalb auf die Optimierung der Methodik und nicht auf die Resultate gelegt.

Es wird empfohlen zukünftig in den Biotests mit Nematoden zu arbeiten, welche gleich alt (bessere Vergleichbarkeit), bestenfalls nicht älter als 3 Wochen sind (gewährleistete Vitalität) und molekulargenetisch identifiziert wurden. Aufgrund der während längerer Zeit nicht zugänglichen Labore (Corona Pandemie) und der daraus resultierenden Zeitknappheit, wurde in den Versuchen dieser Masterarbeit mit älteren und zufällig gewählten Nematoden gearbeitet.

#### **5.3.1 Biotest Stufe 1**

Durch den Einsatz zufällig gewählter Nematoden, wurden unter anderem Saprobionten und Duplikate getestet. Eine vorgängige molekulargenetische Identifikation führt zu geringerem Arbeits- und Materialaufwand.

Nach der Identifikation sollte jede Nematodenart aus den einzelnen Mischproben mittels dem Biotest Stufe 1 getestet werden. Wiederholungen in den Mischproben müssen jedoch nicht erneut getestet werden. Beispiel: *Steinernema feltiae* vom Standort Grüental aus der Mischprobe 1, sowohl *S. feltiae* vom Standort Grüental aus der Mischprobe 2 werden beide getestet. Wird jedoch *S. feltiae* zwei Mal aus der gleichen Mischprobe isoliert, muss diese nicht wiederholt getestet werden. So können unterschiedliche Leistungen der Nematodenarten abhängig vom Standort festgestellt werden.

Während des Versuchs wäre die Inkubation der Gewebekulturplatten in Klimaschränken bei kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit (21°C bei ca. 80% Luftfeuchtigkeit), statt in einem geschlossenen Möbel unter unkontrollierten Bedingungen, wissenschaftlicher und vergleichbarer gewesen und sollte deshalb in Zukunft angepasst werden.

Zudem wurde aus Platzgründen die Anzahl Larven pro Nematodenart auf drei definiert. Im Optimalfall würde die Anzahl Wiederholungen auf 6-12 verlaufen. So könnte mit einem Chi<sub>2</sub>-Test mit R-Studio festgestellt werden, ob es sich bei den erhobenen Daten um statistisch signifikante Mortalitäten handelt.

Die Kontrollgänge sollten ebenfalls angepasst werden. Da die Mortalität der Larven in der Regel drei Tage nach Applikation der Nematoden eintritt, müssen vorher keine Kontrollen durchgeführt werden. Auch ist eine Limitierung der Kontrolltage auf etwa 10 Tage sinnvoll, da das Ziel im Japankäferprojekt ist, eine effiziente Nematodenart zu finden, welche nicht lange benötigt, bis sie den Wirt abtötet. So kann der Arbeitsaufwand zudem reduziert werden.

Als Referenzversuch kann die Publikation von Gaugler, Wang und Campbell (1993) genutzt werden. Sie haben 150 statt 100 Nematoden appliziert, was in zukünftigen Versuchen angepasst werden könnte.

Zudem haben sie die Larven 24 h nach der Nematodenapplikation mit frischen Graswurzeln gefüttert, damit diese während der Versuchsdauer nicht verhungern. Alternativ könnten für zukünftige Versuche auch Karottenscheiben zur Fütterung genutzt werden.

Ein weiterer Aspekt, den Gaugler beachtet hat und in der zukünftige Versuchsplanung einbezogen werden könnte: Tote Larven wurden inkubiert, um eine allfällige Ausschwärmung von Nematoden zu beobachten und den Tod durch entomopathogenen Nematoden zu bestätigen.

Die in den Resultaten erhobene erhöhte Mortalitätsrate der *Cetoniinae*-Larven durch die direkt applizierten *S. feltiae* und *S. carpocapsae*, entspricht der Literatur. Sowohl *S. feltiae* (Lacey et al., 1993, Campbell et al., 1998, Li et al., 2007, Helmberger et al., 2018), als auch *S. carpocapsae* (Georgis & Gaugler, 1991, Cui et al., 1993, Lacey et al., 1993, Simoes et al., 1993, Wang et al., 1994, Campbell et al., 1998, Lawrence, A. Lacey et al., 2001, Morris & Grewal, 2011, Marianelli et al., 2018) zeigten in diversen Publikationen bereits eine Mortalität gegen Engerlinge, konkret gegen *P. japonica* Larven, auf. Aufgrund der ähnlichen Systematik der *Cetoniinae* und *P. japonica* Larven, ist ein vergleichbares Resultat in Bezug auf die Mortalität zu erwarten.

### 5.3.2 Biotest Stufe 2

Aufgrund der geringen Nematoden-Verfügbarkeit, wurden nur 50 Nematoden pro Topf appliziert, was eine sehr kleine Anzahl ist. Im Vergleich wird bei dem Nematodenprodukt «Galanem» von Andermatt Biogarten (welches gegen Gartenlaubkäferlarven verwendet wird) empfohlen, 50 Millionen Nematoden auf 50 m<sup>2</sup> Feldfläche auszubringen (Andermatt Biogarten, kein Datum). Auf die Fläche eines 13 cm Durchmesser-Topf (177 cm<sup>2</sup>) umgerechnet, wären das 176'000 Nematoden/Topf. Es wird deshalb dringend empfohlen die Nematodenzahl/Topf zukünftig nach oben anzupassen.

Um während der Inkubation einer stabilen Temperatur von z.B. 21°C zu gewährleisten, müssten die Töpfe in einen Klimaschrank mit Tagesbeleuchtung gestellt werden. Der Abstellort direkt am Fenster erwirkte tagesabhängige Temperaturschwankungen, welche dazu führen, dass Resultate schlecht miteinander vergleichbar sind.

Die als Nebenversuch genutzten Falcontubes, welche mit Larven versetzt wurden, ergaben selbst bei der Kontrolle eine Mortalität von 100%. Optisch schien die nicht vorhandene Durchlüftung zu einer konzentrierten Feuchtigkeit geführt zu haben. Dies könnte die Larven, abgesehen vom fehlenden Sauerstoff, abgetötet haben. Für zukünftige Versuche sollte entweder komplett auf Falcontubes verzichtet, oder zumindest deren Deckel durchlöchert werden. Falcontubes sind dann vorteilhaft, wenn man die Larven regelmässig kontrollieren will, ohne das Substrat zu bewegen.

Für statistische Zwecke sollten zukünftig mehr als nur eine Larve pro Topf verwendet werden. Ebenfalls kann dann besser beurteilt werden, ob nur vereinzelte Larven «verschwinden», oder ob es sich um die ganzen Larvengruppe handelt. So fällt die Interpretation leichter, ob es sich um einen raschen Verwesungsprozess handelt, oder ob einzelne Individuen geflüchtet sind. Als Referenzversuch kann die Publikation von Kaya et al. (1993) verwendet werden, welcher 3 Litertöpfe mit je 10 Larven versetzt hat. Dabei muss beachtet werden, dass die Anzahl verfügbarer Larven keinen limitierenden Faktor darstellen, wie es in dieser Masterarbeit der Fall war.

Für eine statistische Auswertung (Chi<sub>2</sub>-Test) hätten, so wie im Biotest Stufe 1, ebenfalls mehr Wiederholungen (6-12) getätigt werden müssen.

In der deskriptiven Auswertung wurden die Larven, welche nicht mehr auffindbar waren, nicht als tot gezählt, weshalb nur *Steinernema feltiae* vom Standort «Uri Hof» eine Mortalität (60%) verursacht hat. Wie im letzten Kapitel erwähnt, deckt sich die letale Wirkung von *S. feltiae* auf Engerlinge mit der Literatur.

Die Topfversuche von Simoes, Laumond und Bonifassi (1993) fanden zwar auf einem Feld unter unkontrollierten Klimabedingungen statt, können aber dennoch als Vergleich für den Biotest 2 verwendet werden. Sie haben pro Topf (Volumen unbekannt) 3 *P. japonica* Larven eingegraben,

Nematoden appliziert und mit Wurzeln gefüttert. Die abgestorbenen Larven wurden wie bei Gaugler, Wang und Campbell (1993) nach dem Versuch inkubiert und nach ausschwärmenden Nematoden abgesucht, um die Mortalität durch entomopathogenen Nematoden zu bestätigen.

Eine Fütterung mit Karottenscheiben und die Inkubation der verstorbenen Larven wird somit auch für zukünftige Biotests Stufe 2 empfohlen.

Die Hypothese «Ein zweistufiger Biotest zur Bestimmung der Mortalitätsrate von *Cetoniinae*-Larven durch gesammelte entomopathogene Nematoden wird entwickelt und getestet.» konnte mehrheitlich bestätigt werden. Nur die statistische Auswertung mittels  $\chi^2$ -Test konnte aufgrund der geringen Anzahl Wiederholungen nicht getestet werden.

## 6 Schlusswort

Im fortlaufenden Japankäferprojekt werden die entwickelten Biotests demnächst unter Quarantänebedingungen angewendet. Es wird sich zeigen, ob die isolierten entomopathogenen Nematoden einen letalen Effekt auf *Popillia japonica* Larven haben.

Nach dem zweistufigen Biotest gilt es aber noch einige weitere Versuche zu tätigen, bevor ein allfälliges nematodenbasiertes Produkt gegen *P. japonica* Larven auf den Markt gebracht werden kann. Darunter fallen Versuche, welche optimale Bedingungen, wie z.B. Temperatur oder Substratfeuchtigkeit, aber auch die optimale Anzahl Nematoden, für eine möglichst hohe Larvenmortalität untersuchen.

Auch sollten Freilandversuche geplant werden, zum Beispiel im Piemont (IT), wo bereits ein *P. japonica* Befall existiert, um die Nematoden unter natürlichen Bedingungen auf dem Feld zu testen. So wurde es bisher auch schon von diversen Wissenschaftlern, wie z.B. Helmberger et al. (2018) gemacht.

Allgemein ist die Entwicklung von Produkten gegen *P. japonica* wichtig, denn es ist damit zu rechnen, dass *P. japonica* sich in den kommenden Jahren in der Schweiz verbreiten und etablieren wird. V.a. entlang der Nord-Süd-Verkehrsachse ist mit einer Verschleppung durch die menschliche Mobilität zu rechnen. Deshalb sollte so bald wie möglich eine effiziente Bekämpfungsstrategie verfügbar sein, welche in der Schweiz bewilligt werden kann, um die weitere Verbreitung von *P. japonica* zu reduzieren, oder diesen punktuell zu bekämpfen.

In diesem Zusammenhang ist auch wichtig, dass verschiedene Akteure wie der Bund, die Politik, kantonale Beratungsdienste, die Landwirtschaft, Produktevertreiber und die Forschung zusammenarbeiten und sich unterstützen, um gemeinsam eine effiziente Lösung für das Problem *P. japonica* zu finden und durchzusetzen.

Der Aktionsplan Pflanzenschutz vom Bund, die vorherrschenden Risiken durch die Nutzung chemisch synthetischer Pflanzenschutzmittel (Bundesrat, 2017) und die Bevölkerung, die in den letzten Jahren vermehrtes Interesse an biologischen Bekämpfungsstrategien, wie die «Trinkwasserinitiative» (Verein Sauberes Wasser für alle, ohne Datum) und die «Initiative für eine Schweiz ohne synthetische Pestizide» (Vereinigung Für eine Schweiz ohne synthetische Pestizide, ohne Datum) gezeigt haben, sind Argumente, welche für die Weiterentwicklung biologischer Bekämpfungsstrategien sprechen.

Ergebnisse aus Versuchen im Ausland (vergl. Kapitel 0 und 2.5) zeigen, dass diverse biologische Bekämpfungsstrategien gegen *P. japonica* vorhanden sind und viel Potenzial haben. V.a. dann, wenn sie kombiniert angewendet werden. Oft werden diese jedoch aus Kostengründen oder geringerer Effizienz im Vergleich zu Insektiziden schlechter verkauft.



Es bleibt zu hoffen, dass in absehbarer Zeit positive Forschungsergebnisse in der schweizerisch biologischen Schädlingsbekämpfung erzielt werden, sei es im Bereich entomopathogene Nematoden oder Pilze und deshalb mehrheitlich auf eine Nutzung von chemisch synthetischen Pflanzenschutzmitteln abgesehen werden kann.

## 7 Literaturverzeichnis

- Agroscope. (2019). *Pilze gegen den eingewanderten Japankäfer*. Abgerufen am 13. November 2019 von [https://www.wbf.admin.ch/wbf/de/home/dokumentation/nsb-news\\_list.msg-id-67978.html](https://www.wbf.admin.ch/wbf/de/home/dokumentation/nsb-news_list.msg-id-67978.html)
- Agroscope. (ohne Datum). *Japankäfer*. Abgerufen am 13. November 2019 von [www.popillia.agroscope.ch](http://www.popillia.agroscope.ch)
- Allsopp, P. G., Klein, M. G., McCoy, E. L. (1992). Effect of soil moisture and soil texture on oviposition by Japanese beetle and rose chafer (Coleoptera: Scarabaeidae). *Econ. Entomol.* S. 194–200.
- Ahmad, S. (1982). Host location by the Japanese beetle (*Popillia japonica*): evidence for a key role for olfaction in a highly polyphagous insect. *Exp. Zool.*, 220. S.117–20.
- Alm, S. R., Yeh, T., Hanula, J. L., Georgis, R. (1992). Biological control of Japanese, oriental, and black turfgrass ataenius beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae with entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Econ. Entomol.*, 87. S. 775–80.
- Alm, S. R., Yeh, T., Dawson, C. G., Klein, M. G. (1996). Evaluation of trapped beetle repellency, trap height, and string pheromone dispensers on Japanese beetle captures (Coleoptera: Scarabaeidae). *Environ. Entomol.*, 25. S. 74–78.
- Andermatt Biocontrol. (ohne Datum). *Heterorhabditis bacteriophora*. Abgerufen am 08. Juli 2020 von <https://www.andermttbiocontrol.com/sites/products/macroorganisms/entomopathogenic-nematodes/heterorhabditis-bacteriophora.html>
- Andermatt Biogarten. (ohne Datum). *Galanem*. Abgerufen am 15. Juni 2020 von <https://www.biogarten.ch/de/gartenlaubkaefer-bekaempfen>
- Andreadis, T. G., Hanula, J. L. (1987). Ultra-structural study and description of *Ovavesicula popilliae* N. G., N. Sp. (Microsporida: Pleistophoridae) from the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Protozool*, 34. S.15–21
- Bertoglio, M., Ceriani, F., Abelli, A., Kron Morelli, R., Cassani, S., & Suss, L. (2018). *Popillia Japonica*: Valutazione Dell'Efficacia di due Strategie di Controllo Cilogico in Condizioni controllate. *ATTI Giornate Fitopatologiche*, 1. S. 439–444.
- BLW. (2020). *Quarantäneorganismen*. Abgerufen am 07. Juli 2020 von <https://www.blw.admin.ch/blw/de/home/nachhaltige-produktion/Pflanzengesundheit/schaedlingeundkrankheiten/quarantaeneorganismen.html>

- Bundesamt für Landwirtschaft. (2020a). Allgemeinverfügung über die Bewilligung eines Pflanzenschutzmittels in besonderen Fällen. SR 172.021. S. 1-2.
- Bundesamt für Landwirtschaft. (2020b). *Ganz schön gefährlicher Japankäfer*. Abgerufen am 15. Juni 2020 von <https://www.blw.admin.ch/blw/de/home/services/medienmitteilungen.msg-id-78411.html>
- Bohlen, P. J., Barrett, G. W. 1990. Dispersal of the Japanese beetle (Coleoptera:Scarabaeidae) in strip-cropped soybean agroecosystems. *Environ. Entomol.*, 19. S. 55–60.
- Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., Di Serio, F., Gonthier, P. Jacques, M., Miret, J., Justesen, A., Magnusson, C., Milonas, P., Navas Cortés, J., Parnell, S., Potting, R., Reignault, P., Thulke, H., Werf, W., Civera, A., Yuen, J., Zappalà, L., Czwieniczek, E., Macleod, A. (2018). Pest categorisation of *Popillia japonica*. *EFSA Journal*, 16.
- Bundesrat. (2017). *Aktionsplan\_Pflanzenschutzmittel*. Schweizerische Eidgenossenschaft.
- CABI. (2019a). *Heterorhabditis bacteriophora*. Abgerufen am 11. Juli 2020 von: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/26986>
- CABI. (2019b). *Popillia japonica*. Abgerufen am 08. Juli 2020 von <https://www.cabi.org/isc/datasheet/43599>
- CABI. (2019c). *Steinernema carpocapsae*. Abgerufen am 10. Juli 2020 von <https://www.cabi.org/isc/datasheet/51706>
- CABI. (2019d). *Steinernema feltiae*. Abgerufen am 10. Juli 2020 von <https://www.cabi.org/isc/datasheet/51707>
- CABI. (2019e). *Steinernema glaseri*. Abgerufen am 10. Juli 2020 von <https://www.cabi.org/isc/datasheet/51708>
- CABI. (2019f). *Steinernema riobravis*. Abgerufen am 10. Juli 2020 von <https://www.cabi.org/isc/datasheet/51713>
- Campbell, J. F., Orza, G., Yoder, F., Lewis, E., & Gaugler, R. (1998). Spatial and temporal distribution of endemic and released entomopathogenic nematode populations in turfgrass. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86(1). S. 1–11. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00260.x>
- Clark, M. S., Gage, S. H. (1996). Effects of free-range chickens and geese on insect pests and weeds in an agroecosystem. *Altern. Agric.*, 11. S. 39–47.
- Clausen, C., King, J., & Teranishi, C. (1927). The parasites of *Popillia japonica* in Japan and Chosen (Korea) and their introduction into the United States. *USDA Tech. Bull*, 1429, S. 56.

- Cramer, M. E., Demchak, K., Marini, R., Leskey, T. (2019). UV-blocking High-tunnel Plastics Reduce Japanese Beetle (*Popillia japonica*) in Red Raspberry, *HortScience horts*, 54(5), S. 903-909. <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/54/5/article-p903.xml>
- Crutchfield, B. A., Potter, D. A. (1995). Feeding by Japanese beetle and southern masked chafer grubs on lawn weeds. *Crop Sci.*, 35(16) S. 81–84.
- Cui, L., Gaugler, R., & Wang, Y. (1993). Penetration of Steinernematid Nematodes (Nematoda: Steinernematidae) into Japanese Beetle Larvae, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 62(1). S. 73–78. <https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1077>
- Davidson, A. W., Potter, D. A. (1995). Response of plant-feeding, predatory, and soil-inhabiting invertebrates to *Acremonium* endophyte and nitrogen fertilization in tall fescue turf. *Econ. Entomol.*, 3. S. 67–79.
- DalThorpe D., Nyrop, J., Villani, M. G. (1999). Estimation of local mean population densities of Japanese beetle grubs (Scarabaeidae: Coleoptera). *Environ. Entomol.*, 28(2), S. 55–65.
- DalThorpe, D., Nyrop, J., Villani, M. G. (2000). Spatial ecology of the Japanese beetle, *Popillia japonica*. *Entomol. Exp. Appl.* 96: S. 129–139.
- DeBach, P., Rose M. (1977). Upsets caused by chemical eradication. *Citrograph.* 62: 162–164.
- Dewerff, R., Jensen, B., Liesch, P. J., Nice, G., Renz, M., Smith, D., Werle, R. (2019a). Corn insect management. *University of Wisconsin Cooperative Extension Publishing*. S. 53-94.
- Dewerff, R., Jensen, B., Liesch, P. J., Nice, G., Renz, M., Smith, D., Werle, R. (2019b). Soybean insect management. *University of Wisconsin Cooperative Extension Publishing*. S. 130-154.
- Downing, A. S. (1994). Effect of irrigation and spray volume on efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Econ. Entomol.* 87(6). S. 43–46.
- Edwards, C. R. (1999). Japanese beetle. Handbook of corn insect pests. *Entomological Society of America*. S. 90-91.
- EMPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2006). *Popillia japonica*. Bulletin. 36: 447–450.
- EPA US, Environmental Protection Agency. (2003). UN PIC & U.S. Pic-nominate pesticides list. <http://www.pic.int/Countries/CountryProfile/tabid/1087/language/en-US/Default.aspx>
- EPPO. (2020). *Popillia japonica* Distribution. Abgerufen am 07. Juli 2020 von <https://gd.eppo.int/taxon/POPIJA/distribution>

- EPPO. (ohne Datum a). *Popillia Japonica Hosts*. Abgerufen am 07. Juli 2020 von <https://gd.eppo.int/taxon/POPIJA/hosts>
- EPPO. (ohne Datum b). *Popillia japonica Photos*. Abgerufen am 07. Juli 2020 von <https://gd.eppo.int/taxon/POPIJA/photos>
- Fleming, W. E. (1968). Biological control of the Japanese beetle. *USDA Tech. Bulletin* 1383. S. 78.
- Fleming, W. E. (1969). Attractants for the Japanese beetle. *USDA Tech. Bulletin* 1399. S. 87.
- Fleming, W. E. (1972). Biology of the Japanese beetle. *Tech. Bulletin* 1449.
- Fleming, W. E. (1976). Integrating Control of the Japanese Beetle: A Historical Review. *Agricultural Research Service, UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE*, 1545. S. 72.
- Forschler, B. T., Gardner, W. A. (1991). Parasitism of *Phyllophaga hirticula* (Coleoptera: Scarabaeidae) by *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema carpocapsae*. *Invertebr. Pathol.* 58. S. 386–407.
- Frank, J. H. (2009) *Steinernema scapterisci* as a Biological Control Agent of *Scapteriscus* Mole Crickets. *Springer, Dordrecht*. 6.
- Garcia, del Pino, F., Palomo, A. (1995). A new strain of *Steinernema anomali* (Kozodoi, 1984) from Spain. *COST 819 — Ecology and Transmission Strategies of Entomopathogenic Nematodes*. S. 110–111.
- Gaugler, R., Campbell, J. F. (1991). Selection for enhanced host-finding of scarab larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) in an entomopathogenic nematode. *Environ. Entomol*, 20 (70): S. 0–6.
- Gaugler, R., Wang, Y. I., & Campbell, J. F. (1994). Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: Defenses against entomopathogenic nematode attack. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64(3). S. 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(94\)90150-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(94)90150-3)
- Georgis, R., & Gaugler, R. (1991). Predictability in Biological Control Using Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Economic Entomology*, 84(3). S. 713–720. <https://doi.org/10.1093/jee/84.3.713>
- Gilmore, S. K., Potter, D. A. (1993). Potential role of Collembola as biotic mortality agents for entomopathogenic nematodes. *Pedobiologia*, 37. S. 30–38.

- Giroux, F., Lavallée, R., Bauce, É., & Guertin, C. (2015). Susceptibility of the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Newman) (Coleoptera: Scarabaeidae), to entomopathogenic Hypocreales fungi. *Phytoprotection*, 95(1). S. 1–6. <https://doi.org/10.7202/1028399ar>
- Grewal, P. S., Gaugler, R., Lewis, E. E. (1993). Host recognition behavior by entomopathogenic nematodes during contact with insect gut contents. *Parasitol*, 79. S. 495–503.
- Grewal, P. S., Gaugler, R., Selvan, S. (1993). Host recognition behavior by entomopathogenic nematodes: behavioral response to contact with host feces. *Chem. Ecol.*, 19(12). S. 19–31.
- Grewal, S. K., Grewal, P. S., & Gaugler, R. (1995). Endophytes of fescue grasses enhance susceptibility of *Popillia japonica* larvae to an entomopathogenic nematode. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 74. S. 219–224. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1995.tb01894.x>
- Grewal, P. S., Lewis, E. E., Venkatachari S. (1999). Allelopathy: A possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. *Nematology*, 1. S. 735–743.
- Gould, G. E. (1963). Japanese beetle damage to soybeans and corn. *Econ. Entomol.*, 56. S. 776–781.
- Hammond, R. B., Stinner, B. R. (1987). Soybean foliage insects in conservation tillage systems: effects of tillage, previous cropping history, and soil insecticide application. *Environ. Entomol.*, 16: S. 524–531.
- Hammond, R. B. (1994). Japanese beetle. In L. G. Higley and D. J. Boethel (eds.), Handbook of soybean insect pests. *Entomological Society of America*. S. 64-65.
- Harry, D., Niemczyk. (1975). Status of Insecticide Resistance in Japanese Beetle in Ohio. *Journal of Economic Entomology*, 68(5). S. 583–584. <https://doi.org/10.1093/jee/68.5.583>
- Helmberger, M. S., Thaler, J. S., Shields, E. J., & Wickings, K. G. (2018). Entomopathogenic nematode performance against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) in school athletic turf: Effects of traffic and soil properties. *Biological Control*, 126. S. 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.010>
- Hofer, S. (2019). *Referenzprojekte der Forschungsgruppe Phytomedizin*. Abgerufen am 15. Juni 2020 von <https://www.zhaw.ch/de/lfsfm/institute-zentren/iunr/environmental-and-agrofood-systems/phytomedizin/referenzprojekte/>

- Hölling, D. (2018). *Japankäfer – eine invasive Art vor der Schweizer Grenze*. Abgerufen am 13. November 2019 von [https://www.waldwissen.net/waldwirtschaft/schaden/invasive/wsl\\_japankaefer/index\\_DE](https://www.waldwissen.net/waldwirtschaft/schaden/invasive/wsl_japankaefer/index_DE)
- Holmes, D. M., Barrett, G. W. (1997). Japanesebeetle (*Popillia japonica*) dispersal behavior in intercropped vs. monoculture soybean agroecosystems. *Am. Midl. Nat.*, 137(3). S. 12–19.
- Hoshikawa, K., Tsutsui, H., Honma, K., Sakagami, S. F. (1988). Cold resistance in four species of beetles overwintering in the soil, with notes on the overwintering strategies of some soil insects. *Appl. Entomol. Zool.*, 23(2). S. 71–81.
- Hudson, B. (2017). Japanese beetle outbreak among the worst in Minnesota. <https://minnesota.cbslocal.com/2017/07/31/japanese-beetle-outbreak/>
- Isaacs, R., Szendrei, Z., Wise, J. C. (2003). Michigan blueberry facts: Japanese beetle. *Extension Bulletin E-2845*.
- Ishida, Y., Leal, W. S. (2008). Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105. S. 9076–9080.
- Jordan, T. A., Youngman, R. R., Laub, C. L., Tiwari, S., Kuhar, T. P., Balderson, T. K., Moore, D. M., Saphir, M. (2012). Fall soil sampling method for predicting spring infestation of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in corn and the benefits of clothianidin seed treatment in Virginia. *Crop Prot.*, 39. S. 57–62.
- Kaya, H. K., Burlando, T. M., & Thurston, G. S. (1993). Two Entomopathogenic Nematode Species with Different Search Strategies for Insect Suppression. *Environmental Entomology*, 22(4). S. 859–864. <https://doi.org/10.1093/ee/22.4.859>
- Klein, M. G. (1981). Mass trapping for suppression of Japanese beetles. In *Management of Insect Pests with Semiochemicals*. S. 183–90.
- Klein, M. G. (1993). Biological control of scarabs with entomopathogenic nematodes. In *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. S. 49–58.
- Klein, M. G., Lacey, L. A. (1999). An attractant trap for autodissemination of entomopathogenic fungi into populations of the Japanese beetle *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Sci. Technol.*, 9(1). S. 51–58.
- Koppenhöfer, A. M., Kaya, H. K. (1998). Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub control in turfgrass. *J. Econ. Entomol.*, 91(6) S. 18–23.

- Koppenhofer, A. M., Grewal, P. S., & Kaya, H. K. (2000). Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs: The mechanism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 94(3). S. 283–293. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00630.x>
- Kreuger, B., Potter, D. A. (2001). Diel feeding activity and thermoregulation by Japanese beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) within host plant canopies. *Environ. Entomol.*, 30(1). S. 72–80.
- Krupke, C. H., Obermeyer, J. L., Bledsoe, L. W. (2017). Soybean insect control recommendations. <https://extension.entm.purdue.edu/publications/E-77.pdf>
- Lacey, L. A., Bettencourt, R., Garrett, F. J., Simoes, N. J., & Gaugler, R. H. (1993). Factors influencing Parasitism of Adult Japanese Beetles, *Popillia japonica* (Col: Scarabaeidae) by entomopathogenic Nematodes. *Entomophaga*, 38(4). S. 501–509.
- Lacey, L. A., Amaral, J. J., Coupland, J., Klein, M. G. (1994). The influence of climatic factors on the flight activity of the Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae): implications for use of a microbial control agent. *Biol. Control*, 4. S. 298–303.
- Lacey, Lawrence A., Martins, A., & Ribeiro, C. (1994). The pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* for adults of Japanese beetle, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Eur. J. Entomol.*, 91. S. 313–319.
- Lacey, L. A., Amaral, J. J., Coupland, J., Klein, M. G., Simoes, A. M. (1995). Flight activity of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) after treatment with *Metarhizium anisopliae*. *Biol. Control*, 5(1). S. 67–72.
- Lacey, L. A., Kaya, H. K., & Bettencourt, R. (1995). Dispersal of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) in adult Japanese beetles, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Science and Technology*, 5(1). S. 121–130. <https://doi.org/10.1080/09583159550040060>
- Lacey, Lawrence A., Rosa, J. S., Simoes, N. O., Amaral, J. J., & Kaya, H. K. (2001). Comparative dispersal and larvicidal activity of exotic and Azorean isolates of entomopathogenic nematodes against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *European Journal of Entomology*, 98(4). S. 439–444. <https://doi.org/10.14411/eje.2001.064>
- Ladd, T. L., Jr. (1970). Sex attraction in the Japanese beetle. *Econ. Entomol.*, 63(90). S. 5–8.
- Ladd, T. L., Jr., Coppinger, A. J., Harris, R. F., Petty, D. M., Hamilton, D. W., Bruer, H. L. (1972). Effects of releasing sterile male Japanese beetles on the fertility of ova of an isolated population in eastern Tennessee. *Econ. Entomol.*, 65(13). S. 38–40.



- Ladd, T. L., Jr., Jacobson, M., Buriff, C. R. (1978). Japanese beetles: extracts from neem tree seeds as feeding deterrents. *Econ. Entomol.*, 71. S. 810–813.
- Ladd, T. L., Jr., McGovern, T. P. (1980). Japanese beetle: a superior attractant, phenethyl propionate Ceugenol Cgeraniol 3:7:3. *Econ. Entomol.* 73(6). S. 89–91.
- Ladd, T. L., Jr., Warthen, J. D., Jr., Klein, M. G. (1984). Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae): the effects of azadirachtin on the growth and development of the immature forms. *Econ. Entomol.*, 77. S. 903–905.
- Ladd, T. L., Jr. (1987). Influence of food, age, and mating on production of fertile eggs by Japanese beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). *Econ. Entomol.*, 80. S. 93–95.
- Ladd, T. L., Jr. (1989). Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae): feeding by adults on minor host and nonhost plants. *Econ. Entomol.*, 82(26). S. 16–19.
- Lewis, E. E., Gaugler, R., Harrison, R. (1992). Entomopathogenic nematode host finding: response to contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*, 105(30). S. 9–15.
- Lewis, E. E., Gaugler, R., Harrison, R. (1993). Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Can. Zool.*, 71(7). S. 65–69.
- Li, X.-Y., Cowles, R. S., Cowles, E. A., Gaugler, R., & Cox-Foster, D. L. (2007). Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *International Journal for Parasitology*, 37(3–4). S. 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.08.009>
- Liu, J., Berry R. E. (1996). *Heterorhabditidis marelatus* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Oregon. *Journal of Invertebrate Pathology* 67(1). S. 48–54.
- López, R., Potter, D. A. (2000). Ant predation on eggs and larvae of the black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) and Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) in turf-grass. *Environ. Entomol.*, 29(1). S. 16–25.
- Loughrin, J. H., Potter, D. A., Hamilton-Kemp, T. R. (1995). Volatile compounds induced by herbivory act as aggregation kairomones for the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newman). *Chem. Ecol.*, 21(14). S. 57–67.
- Loughrin, J. H., Potter, D. A., Hamilton-Kemp, T. R., Byers, M.E. (1996). Volatile compounds from crabapple cultivars (*Malus* spp.) differing in susceptibility to the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newman). *Chem. Ecol.*, 22(1). S. 295–305.
- Loughrin, J. H., Potter D. A., Hamilton-Kemp, T. R., Byers, M. E. (1997a). Diurnal emission of volatile compounds by Japanese beetle-damaged grape leaves. *Phyto-chemistry*, 45(9). S. 19–23.

- Loughrin, J. H., Potter, D. A., Hamilton-Kemp, T. R., Byers, M. E. (1997b). Response of Japanese beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) to leaf volatiles of susceptible and resistant maple species. *Environ. Entomol.*, 26(3). S. 34–42.
- Mamiya, Y. (1988). *Steinernema kushidai* n. Sp. (Nematoda: Steinernematidae) Associated with Scarabaeid Beetle Larvae From Shizuoka, Japan. *Applied Entomology and Zoology*, 23(3). S. 313–320. <https://doi.org/10.1303/aez.23.313>
- Mannion, C. M., Winkler, H. E., Shapiro, D. I., Gibb, T. (2000). Interaction between halofenozide and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis marelatus* for control of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Econ. Entomol.*, 93. S. 48–53.
- Marianelli, L., Paoli, F., Torrini, G., Mazza, G., Benvenuti, C., Binazzi, F., Sabbatini Peverieri, G., Bosio, G., Venanzio, D., Giacometto, E., Priori, S., Koppenhöfer, A. M., & Roversi, P. F. (2018). Entomopathogenic nematodes as potential biological control agents of *Popillia japonica* (Coleoptera, Scarabaeidae) in Piedmont Region (Italy). *Journal of Applied Entomology*, 142(3). S. 311–318. <https://doi.org/10.1111/jen.12470>
- Martins, A., Simões, N. (1988). Suppression of the Japanese beetle in the Azores: an ecological approach. *Ecological Bulletins*, 39. S. 99–100.
- Mazza, G., Paoli, F., Strangi, A., Torrini, G., Marianelli, L., Peverieri, G. S., Binazzi, F., Bosio, G., Sacchi, S., Benvenuti, C., Venanzio, D., Giacometto, E., Roversi, P. F., & Poinar, G. O. (2017). *Hexamermis popilliae* n. sp. (Nematoda: Mermithidae) parasitizing the Japanese beetle *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae) in Italy. *Systematic Parasitology*, 94(8). S. 915–926. <https://doi.org/10.1007/s11230-017-9746-0>
- Mbata, G., Shapiro-Ilan, D., Nguyen, K. (2008). *Heterorhabditis georgiana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Georgia, USA, *Nematology*, 10(3). S. 433–448. doi: <https://doi.org/10.1163/156854108783900276>
- McMullen, J. G., & Stock, S. P. (2014). In vivo and In vitro Rearing of Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Journal of Visualized Experiments*, 91, 52096. <https://doi.org/10.3791/52096>
- Morales-Rodriguez, A., & Peck, D. C. (2009). Synergies between biological and neonicotinoid insecticides for the curative control of the white grubs *Amphimallon majale* and *Popillia japonica*. *Biological Control*, 51(1). S. 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.06.008>
- Morris, E. E., & Grewal, P. S. (2011). Susceptibility of the Adult Japanese Beetle, *Popillia japonica* to Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Nematology*, 43(3–4). S. 196–200.

- NCBI. (ohne Datum a). *Oscheius*. Abgerufen am 21. Juni 2020 von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=42476&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- NCBI. (ohne Datum b). *Steinernema*. Abgerufen am 21. Juni 2020 von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=34507&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- NCBI und NIH. (ohne Datum). *Standard Nucleotide BLAST*. Abgerufen am 20.05.2020 von [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
- Nguyen, K. B., Smart, G. C., Jr. (1990). *Steinernema scapterisci* n. sp. (Steinernematidae: Nematoda). *Journal of Nematology*, 22. S. 187-199.
- Nguyen, K. (1999). *Featured Creatures: Steinernema scapterisci*. Abgerufen am 11. Juli 2020 von [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/mole\\_cricket\\_nematode.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/mole_cricket_nematode.htm)
- O'Hara, J. E. (2014). New tachinid records for the United States and Canada. *The Tachinid Times*. 27. S. 34–40.
- Ohba, M., Iwahana, H., Asano, S., Suzuki, N., Sato, R., Hori, H. (1992). A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis with a high larvicidal activity specific for scarabaeid beetles. *Lett. Appl. Microbiol.*, 14. S. 54–57.
- Paoli, F., Marianelli, L., Binazzi, F., Mazza, G., Benvenuti, C., Sabbatini Peverieri, G., Bosio, G., Venanzio, D., Giacometto, E., Klein, M., & Roversi, P. F. (2017). EFFECTIVENESS OF DIFFERENT DOSES OF HETERORHABDITIS BACTERIOPHORA AGAINST POPILLIA JAPONICA 3rd INSTARS: LABORATORY EVALUATION AND FIELD APPLICATION. *Redia*, 100. S. 135–138. <http://dx.doi.org/10.19263/REDIA-100.17.17>
- Paoli, F., Marianelli, L., Torrini, G., Mazza, G., Benvenuti, C., Bosio, G., Venanzio, D., Tarasco, E., Klein, M., & Roversi, P. F. (2017). Differential susceptibility of *Popillia japonica* 3rd instars to *Heterorhabditis bacteriophora* (Italian strain) at three different seasons. *Biocontrol Science and Technology*, 27(3). S. 439–444. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1285866>
- Pavesi, M. (2014). *Popillia japonica* specie aliena invasiva segnalata in Lombardia. *L'Informatore Agrario*, 32. S. 53–55.

- Petty, B. M., Johnson, D. T., Steinkraus, D. C. (2015). Changes in abundance of larvae and adults of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae: Rutelinae) and other white grub species in Northwest Arkansas and their relation to regional temperatures. *Fla. Entomol.*, 98. S. 1006–1008.
- Piñero, J. C., Dudenhoeffer, A. P. (2018). Mass trapping designs for organic control of the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Pest. Manag. Sci.*, 74. S. 1687–1693. doi:[10.1002/ps.4862](https://doi.org/10.1002/ps.4862)
- Poinar, G. O. (1979). Nematodes for Biological Control of Insects. *CRC Press*.
- Poinar, G. O., Jackson, T., & Klein, M. (1987). *Heterorhabditis megidis* sp. N. (Heterorhabditidae: Rhabditida), Parasitic in the Japanese Beetle, *Popillia japonica* (Scarabaeidae: Coleoptera), in Ohio. 54(1). S. 7.
- Poinar, G. O. (1990). Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In R. Gaugler and H. K. Kaya eds. Entomopathogenic nematodes in biological control. *CRC Press*. S. 23–62.
- Potter, D. A. (1998). Destructive Turfgrass Insects. Biology, Diagnosis, and Control. *Ann Arbor Press*. S. 344.
- Potter, D. A., & Held, D. W. (2002). Biology and Management of the Japanese Beetle. *Annual Review of Entomology*, 47(1). S. 175–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145153>
- Potter, D. A., Patterson, C. G., Redmond, C. T. (1992). Influence of turfgrass species and tall fescue endophyte on feeding ecology of Japanese beetle and southern masked chafer grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Econ. Entomol.*, 85(90). S. 0–9.
- Potter, D. A., Powell, A. J., Spicer, P. G., Williams, D.W. (1996). Cultural practices affect root-feeding white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in turfgrass. *Econ. Entomol.*, 89(1). S. 56–64.
- Potter, M. F., Potter, D. A., Townsend, L. H. (2006). Japanese beetles in the urban landscape. *ENTFACT*. S. 451. <https://entomology.ca.uky.edu/ef451>
- Power, K. T., An, R., & Grewal, P. S. (2009). Effectiveness of *Heterorhabditis bacteriophora* strain GPS11 applications targeted against different instars of the Japanese beetle *Popillia japonica*. *Biological Control*, 48(3). S. 232–236. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.10.014>

- Régnière, J., Rabb, R. L., Stinner, R. E. (1981). Popillia japonica: simulation of temperature-dependent development of the immatures, and prediction of adult emergence. *Environ. Entomol.* 10. S. 290–296.
- Redmond, C. T., Wallis, L., Geis, M., Williamson, R. C., Potter, D. A. (2019). Strengths and limitations of *Bacillus thuringiensis galleriae* for managing Japanese beetle (*Popillia japonica*) adults and grubs with caveats for cross-order activity to monarch butterfly (*Danaus plexippus*) larvae. *Pest. Manag. Sci.* doi:[10.1002/ps.5532](https://doi.org/10.1002/ps.5532)
- Schroeder, P. V., Villani, M. G., Ferguson, C. S., Nyrop, J. P., Shields, E. J. (1993). Behavioral interactions between Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs and an entomopathogenic nematode (Nematoda: Heterorhabditidae) within turf microcosms. *Environ. Entomol.*, 22. S. 595–600.
- Selvan, S., Gaugler, R., & Campbell, J. F. (1993). Efficacy of Entomopathogenic Nematode Strains Against Popillia Japonica (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvae. *Journal of Economic Entomology*, 86(2). S. 353–359. <https://doi.org/10.1093/jee/86.2.353>
- Selvan, S., Grewal, P. S., Gaugler, R., & Tomalak, M. (1994). Evaluation of Steinernematid Nematodes Against Popillia Japonica (Coleoptera: Scarabaeidae) Larvae: Species, Strains, and Rinse After Application. *Journal of Economic Entomology*, 87(3). S. 605–609. <https://doi.org/10.1093/jee/87.3.605>
- Severson, G. (2017). Japanese beetles hit MN harder than usual. <https://www.kare11.com/article/news/japanese-beetles-hit-mn-harder-than-usual/460814598>.
- Shanovich, H. N., Dean, A. N., Koch, R. L., & Hodgson, E. W. (2019). Biology and Management of Japanese Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) in Corn and Soybean. *Journal of Integrated Pest Management*, 10(1). S. 1–14. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmz009>
- Sharpe, E. S., Detroy, R. W. (1979). Fat body depletion, a debilitating result of milkydisease in Japanese beetle larvae. *Invertebr. Pathol.*, 34. S. 92–94.
- Sim, R. J. (1934). Characters useful in distinguishing larvae of Popillia japonica and other introduced Scarabaeidae from native species. *U.S. Department of Agriculture*.
- Simoës, N., Laumond, C., & Bonifassi, E. (1993). Effectiveness of Steinernema spp. And Heterorhabditis bacteriophora against Popillia japonica in the Azores. *Journal of Nematology*, 25(3). S. 480–485.
- Smith, A. W., Hammond, R. B., Stinner, B. R. (1988). Influence of rye-cover crop management on soybean foliage arthropods. *Environ. Entomol.*, 17(10). S. 9–14.

- Smitley, D. R. (1996). Incidence of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) and other scarab larvae in nursery fields. *Econ. Entomol.*, 89(12). S. 62–66.
- Spicer, P. G., Potter, D. A., McNiel, R. G. (1995). Resistance of crabapple (*Malus* spp.) cultivars to defoliation by the Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). *Econ. Entomol.*, 88. S. 979–985.
- Stock, S. P., Koppenhöfer, A. M. (2003). *Steinernema scarabaei* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a natural pathogen of scarab beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) from New Jersey, USA. *Nematology*, 5. S. 191–204. doi: 10.1163/156854103767139680
- Suzuki, N., Hori, H., Ogiwara, K., Asano, S., Sato, R., et al. (1992). Insecticidal spectrum of a novel isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis*. *Biol. Control*, 2(1). S. 38–42.
- Taboga, L. (1981). *Rhabditis terricola*: An opportunistic nematode parasite of earthworm cocoons. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38(1). S. 22–25. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90029-X](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90029-X)
- Terry, L. A., Potter, D. A., Spicer, P. G. (1993). Insecticides affect predatory arthropods and predation on Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) eggs and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) pupae in turfgrass. *Econ. Entomol.*, 86(8). S. 71–78.
- Thurston, G. S., Kaya, H. K., Gaugler, R. (1994). Characterizing the enhanced susceptibility of milky disease-infected scarabaeid grubs to entomopathogenic nematodes. *Biol. Contr.*, 4. S. 67–73.
- Tumlinson, J. H., Klein, M. G., Doolittle, R. E., Ladd, T. L., Proveaux, A. T. (1977). Identification of the female Japanese beetle sex pheromone: inhibition of male response by an enantiomer. *Science*, 197. S. 789–792.
- Turco, C. P. (1970). *Neoaplectana hoptha* sp. n. (Neoaplectanida Nematoda) a parasite of the Japanese beetle, *Popilla japonica*. *Proc. Helminthol. Soc. Wash*, 37. S. 119–121.
- University of Nebraska. (ohne Datum). *Heterorhabditis species*. Abgerufen am 08. Juli 2020 von *Heterorhabditis megidis*: <https://nematode.unl.edu/epn/epnhetsp.htm>
- United States Department of Agriculture. (2015). *Managing the Japanese Beetle: A Homeowner's Handbook*. Animal and Plant Health Inspection Service.
- USDA/APHIS. (2000). Managing the Japanese Beetle. A Homeowner's Handbook. *US Dept. Agric.* [http://www.pueblo.gsa.gov/cic\\_text/housing/japanese-beetle/jbeetle.Html](http://www.pueblo.gsa.gov/cic_text/housing/japanese-beetle/jbeetle.Html)

- USDA-APHIS, United States Department of Agriculture - Animal and Plant Health Inspection Service. (2015). Managing the Japanese beetle: a homeowner's handbook. [https://www.aphis.usda.gov/plant\\_health/plant\\_pest\\_info/the\\_Japanese\\_beetle/downloads/theJapanesebeetlehandbook.pdf](https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/the_Japanese_beetle/downloads/theJapanesebeetlehandbook.pdf)
- USDA-NASS, United States Department of Agriculture - National Agricultural Statistics Service. (2018). Corn yield and soybean production Up in 2017. [https://www.nass.usda.gov/Newsroom/2018/01\\_12\\_2018.php](https://www.nass.usda.gov/Newsroom/2018/01_12_2018.php)
- Verein Sauberes Wasser für alle. (ohne Datum). *Initiative für sauberes Trinkwasser*. Abgerufen am 20. Juli 2020 von <https://www.initiative-sauberes-trinkwasser.ch/>
- Vereinigung Für eine Schweiz ohne synthetische Pestizide. (ohne Datum). *#Leben statt Gift*. Abgerufen am 20. Juli 2020 von <https://lebenstattgift.ch/>
- Villani, M. G., Wright, R. J. (1988). Entomogenous nematodes as biological controlagents of European chafer and Japanesebeetle (Coleoptera: Scarabaeidae) larvaeinfecting turfgrass. *Econ. Entomol.*, 81(4). S. 84–87.
- Villani, M. G., Nyrop, J. P. (1991). Age-dependent movement patterns of Japanese beetle and European chafer (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in soil-turfgrass microcosms. *Environ. Entomol.*, 20(2). S. 14–51.
- Vittum, P. J., Tashiro, H. (1980). Effect of soil pH on survival of Japanese beetle and European chafer larvae. *Econ. Entomol.*, 73(5). S. 77–79.
- Vittum, P. J. (1984). Effect of lime applications on Japanese beetle (Coleoptera:Scarabaeidae) grub populations in Massachusetts soils. *Econ. Entomol.*, 77(6). S. 87–90.
- Vittum, P. J. (1986). Biology of the Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) in eastern Massachusetts. *Econ. Entomol.*, 79. S. 387–391.
- Vittum, P. J., Morzuch, B. J. (1989). Effect of soil pH on Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) oviposition in potted turf-grass. *Econ. Entomol.*, 83(20). S. 36–39.
- Vittum, P. J., Villani, M. G., Tashiro, H. (1999). Turfgrass insects of the United States and Canada, 2nd ed. *Cornell University Press*.
- Varenhorst, A. J., Wagner, P. M. (2017). Foliar insecticides in soybean. In A. Bachmann (ed.), 2018 South Dakota Pest Management Guide - Com. Soybeans. South Dakota State University, *SDSU Extension, Brookings*. S. 39-52.
- Wang, Y., Campbell, J. F., & Gaugler, R. (1995). Infection of Entomopathogenic Nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Jurnal of invertebrate Pathology*, 66. S. 178–184.

- Wang, Y., & Gaugler, R. (1998). Host and Penetration Site Location by Entomopathogenic Nematodes against Japanese Beetle Larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72(3). S. 313–318. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4805>
- Wang, Y., Gaugler, R., Cui, L. (1994). Variations in immune response of *Popillia japonica* and *Acheta domesticus* to *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* species. *Nematol.*, 26. S. 11–18.
- Wawrzynski, R. P., Ascerno, M. E. (1998). Mass trapping for Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) suppression in isolated areas. *Arboric.* 24(30). S. 3–7.
- Wright, R. J., Villani, M. G., Agudelo-Silva, F. (1988). Steinernematid and heterorhabditid nematodes for control of larval European chafers and Japanese beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) in potted yew. *Econ. Entomol.*, 81(1). S. 52–55.
- Wouts, W. M. (1979). The biology and life cycle of a New Zealand population of *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae). *Nematologica*, 25.
- Yeh, T, Alm, S. R. (1995). Evaluation of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) for biological control of Japanese and oriental beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). *Econ. Entomol.*, 88(12). S. 51–55.
- Zenger, J. T., Gibb, T. J. (2001a). Identification and impact of egg predators of *Cyclocephala lurida* Bland and *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae) in turfgrass. *Environ. Entomol.*, 30(4). S. 25–30.
- Zenger, J. T., Gibb, T. J. (2001b). Impact of four insecticides on Japanese beetle egg predators and white grubs in turfgrass. *Econ. Entomol.*, 94(1). S. 145–49.



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (Titelbild): Foto von Bruce Martin (2008), Morton Arboretum, Lisle, Illinois, USA. ....	1
Abbildung 2: Bilder vom kompletten Lebenszyklus von <i>Popillia japonica</i> . a) Eier; b) 3 Larvenstadien; c) Puppe; d) adulter Käfer (Shanovich et al., 2019). ....	5
Abbildung 3: Globale Verteilung von <i>Popillia japonica</i> (EPPO, 2020). ....	7
Abbildung 4: Darstellung von drei Klimaszenarien zur potenziellen Verbreitung von <i>P. japonica</i> im Jahr 2050: A Potenzielle Verteilung von <i>P. japonica</i> unter aktuellen klimatischen Bedingungen, B unter dem globalen Klimaszenario "CNRM-CM5" und C unter dem globalen Klimaszenario "ACCESS1-0". ....	8
Abbildung 5: Blattschäden durch adulte <i>P. japonica</i> (Shanovich et al., 2019). a) Nahaufnahme Blatt (Erin Hodgson); b) zerfressener Feldabschnitt (Robert Koch). ....	9
Abbildung 6: Befallene Grasfläche durch <i>P. japonica</i> Larven (EPPO, kein Datum b). ....	10
Abbildung 7: Beispiel Probenahme: fünf gesammelte Mischproben (Kreis) à je drei Löcher (x); jeweils bei Strukturen (z.B. Bäume, Fluss) und auf dem Feld. ....	21
Abbildung 8: Töpfe mit Bodenproben in Netzen. ....	21
Abbildung 9: Geöffnetes Netz mit Probe zur Durchsuchung nach toten <i>G. mellonella</i> Larven. ....	22
Abbildung 10: Vorrichtung zur Nematodenextraktion aus <i>G. mellonella</i> Larven. ....	22
Abbildung 11: Filterbehälter mit zu filtrierenden Nematoden in Flüssigkeit. ....	23
Abbildung 12: Petrischalen mit Filterpapier und <i>G. mellonella</i> Larven zur Nematoden-Reinfektion. ....	24
Abbildung 13: Thermal Cycler T100 von Biorad mit PCR-Einstellung für KAPA Robust. ....	26
Abbildung 14: Beispiel Verdünnung anhand des Geldbildes: Nummer 147 = schwache Bande → 20 µl Verdünnung, ca. 30 µl an Microsynth; 145 = starke Bande → 50 µl Verdünnung, 20 µl an Microsynth. ....	28
Abbildung 15: Sequenzanalyse im Programm FinchTV: a) qualitativ schlechte Sequenzierung. Peaks überlappen sich, Differenzierung schwierig. b) qualitativ gute Sequenzierung. Klare und eindeutige Peaks. ....	29
Abbildung 16: Vergleich Vertretung Nukleotide (rote Rahmen) von verschiedenen Organismen in der BLAST Datenbank. a) <i>Steinernema</i> (NCBI, kein Datum b): 27'536 Nukleotide --> oft vertreten, grössere Wahrscheinlichkeit auf prozentuale Übereinstimmungen; b) <i>Oscheius</i> (NCBI, kein Datum a): 312 Nukleotide --> selten vertreten, kleinere Wahrscheinlichkeit auf prozentuale Übereinstimmungen. ....	30

Abbildung 17: Zählschale für Nematoden. ....	31
Abbildung 18: Gewebekulturplatten mit behandelten Larven nach einer Woche Inkubation. ....	31
Abbildung 19: Topf mit Substrat und mittig platzierter Larve.....	32
Abbildung 20: Biotest Stufe 2. Töpfe und Falcontubes in Plastikwanne, verschlossen mit Netz. ....	33
Abbildung 21: ArcGIS Karte mit allen Bodenproben-Standorten (braunes Polygon) in der Schweiz. Sammelperiode Herbst-Winter 2019. ....	39
Abbildung 22: ArcGIS Karte mit Nematoden-Fundorte (farbige Kreuze) am Beispiel Wallis. Sammel- periode Herbst-Winter 2019. ....	40
Abbildung 23: Biotest 1, R-Balkendiagramm zur Visualisierung der zeitabhängigen Mortalität der <i>Cetoniidae</i> Larven nach der Applikation verschiedener Nematoden. ....	41
Abbildung 24: Biotest 2, R Balkendiagramm zur Visualisierung der Mortalität der Larven nach der Applikation verschiedener Nematoden in Töpfen mit Substrat. ....	42

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nematoden mit einem letalen Effekt auf <i>P. japonica</i> und dessen Vorkommen.....	16
Tabelle 2: Zusammensetzung Mastermix. ....	26
Tabelle 3: PCR Programm KAPA Robust mit leichten Anpassungen. ....	26
Tabelle 4: Standorte Probeentnahme und deren Erfolgsbilanz in Form von infizierten <i>Galleria mellonella</i> Larven. ....	34
Tabelle 5: Resultate Sequenzierung nematodenähnliche Organismen, inkl. Fehlerinterpretation..	36

## Anhang

### Anhangsverzeichnis

Anhang A: Anleitung PCR-Kit NucleoSpin Tissue (fischer scientific).....	ii
Anhang B: ZHAW SOP (Standard Operating Procedure) PCR.....	v
Anhang C: Produktdetails KAPA2G Robust DNA Polymersase.....	vii
Anhang D: Produktdetails Nematoden Primers (Microsynth).....	xi
Anhang E: ZHAW SOP Gelelektrophorese.....	xii
Anhang F: ZHAW SOP Gel Evaluation.....	xv
Anhang G: Rohdaten Nematodenisolation und -reinfektion.....	xvii
Anhang H: Gelbilder der isolierten nematodenähnlichen Organismen.....	xx
Anhang I: Beispiel Sequenzierungstabelle für Microsynth.....	xxi
Anhang J: Temperaturlogger (EasyLogGraph) Auswertung zu den Biotests.....	xxii
Anhang K: R Script.....	xxiii
Anhang L: Rohdaten Biotests.....	xxv
Anhang M: Erklärung betreffend das selbstständige Verfassen einer Masterarbeit im Departement Life Sciences und Facility Management.....	xxvi

## Anhang A: Anleitung PCR-Kit NucleoSpin Tissue (fischer scientific)

### NucleoSpin® Tissue

## 5 Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells

### Before starting the preparation:

- Check if Buffer B5 and Proteinase K were prepared according to section 3.
- Set an incubator or water bath to 56 °C.

### 1 Prepare sample

#### Tissue

Cut 25 mg human or animal tissue into small pieces. Place the sample in a microcentrifuge tube (not provided). Proceed with step 2.

*Samples that are difficult to lyse can be ground under liquid nitrogen or may be treated in a mechanical homogenizer (Polytron®, Ultra-Turrax®): Add 25 mg of tissue to a 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), add 50–75 µL phosphate buffered saline (PBS) and homogenize.*

#### Cultured cells

Resuspend up to **10<sup>7</sup> cells** in a final volume of **200 µL Buffer T1**. Add **25 µL Proteinase K** solution and **200 µL Buffer B3**. Vortex to mix and incubate the sample at 70 °C for 10–15 min. **Proceed with step 4.**

### 2 Pre-lyse sample

Add **180 µL Buffer T1** and **25 µL Proteinase K** solution. Vortex to mix. Be sure that the samples are completely covered with lysis solution.



**+ 180 µL T1**  
**+ 25 µL**  
**Proteinase K**  
**Mix**

*If processing several samples, Proteinase K and Buffer T1 may be premixed directly before use. Do not mix Buffer T1 and Proteinase K more than 10–15 min before addition to the sample: Proteinase K tends to self-digest in Buffer T1 without substrate.*

## NucleoSpin® Tissue

Incubate at **56 °C** until complete lysis is obtained (**at least 1–3 h**). Vortex occasionally during incubation or use a shaking incubator.

*Samples can be incubated overnight as well. If RNA-free DNA is crucial for downstream applications, a RNase digest may be performed: Add 20 µL RNase A (10 mg/mL) solution (not included; see ordering information) and incubate for an additional 5 min at room temperature.*



**56 °C,  
1–3 h  
or  
56 °C,  
overnight**

### 3 Lyse sample

Vortex the samples. Add **200 µL Buffer B3**, vortex vigorously and incubate at **70 °C** for **10 min**. Vortex briefly.

*If insoluble particles are visible, centrifuge for 5 min at high speed (e.g., 11,000 x g) and transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube (not provided).*



**+ 200 µL B3  
70 °C,  
10 min**

### 4 Adjust DNA binding conditions

Add **210 µL ethanol (96–100 %)** to the sample and vortex vigorously.

*After addition of ethanol a stringy precipitate may become visible. This will not affect the DNA isolation. Be sure to load all of the precipitate on the column in the following step.*



**+ 210 µL  
ethanol  
Vortex**

### 5 Bind DNA

For each sample, place one **NucleoSpin® Tissue Column** into a Collection Tube. Apply the sample to the column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard Collection Tube with flowthrough and place the column in a new Collection Tube (provided).

*If the sample is not drawn completely through the matrix, repeat the centrifugation step at 11,000 x g. Discard flowthrough.*



**Load samples**



**11,000 x g,  
1 min**

# NucleoSpin® Tissue

## 6 Wash silica membrane

### 1<sup>st</sup> wash

Add **500 µL Buffer BW**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flowthrough and place the column back into the Collection Tube.



+ 500 µL BW  
11,000 x g,  
1 min

### 2<sup>nd</sup> wash

Add **600 µL Buffer B5** to the column and centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flowthrough and place the column back into the Collection Tube.



+ 600 µL B5  
11,000 x g,  
1 min

## 7 Dry silica membrane

Centrifuge the column for **1 min** at **11,000 x g**.  
Residual ethanol is removed during this step.



11,000 x g,  
1 min



## 8 Elute highly pure DNA

Place the NucleoSpin® Tissue Column into a 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided) and add **100 µL Buffer BE**. Incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge **1 min** at **11,000 x g**.



+ 100 µL BE

RT,  
1 min

*For alternative elution procedures see section 2.3.*



11,000 x g,  
1 min

## Anhang B: ZHAW SOP (Standard Operating Procedure) PCR

N-HM Polymerase Chain Reaction

Zürcher Hochschule  
für Angewandte Wissenschaften



Life Sciences and  
Facility Management

Research Group EGSB

### Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### 1 General Info

Object / Project	BioRad Thermal Cycler T100 und SensoQuest Labcycler
Purpose	This SOP describes the implementation of a PCR reaction as well as the operation of the BioRad T100 Thermal Cyclers and the SensoQuest Labcyclers
Area of application	Institute for Natural Resource Sciences, Lab RT244
Further applicable documents	<ul style="list-style-type: none"><li>• N-HB Laboratory regulations EGSB</li><li>• Methodensammlung UGSB</li><li>• User handbooks</li><li>• Green M.R. and Sambrook, J. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.</li><li>• Product information sheets</li><li>• Libreja -&gt; Equipment specifications and PDF-manuals</li><li>• List of chemicals -&gt; Moodle</li></ul>

#### 2 Definitions and safety recommendations

- As general safety precautions a lab coat and nitrile gloves must be worn at all times.
- Recommendations for handling chemicals are described in the respective material safety data sheets (MSDS) and must be followed scrupulously.

#### 3 Material

Table 1: Material for PCR

Thermocyclers	<ul style="list-style-type: none"><li>• BioRadT 100 Thermal Cyclers Inventory number: 0004056/0004057</li><li>• SensoQuest Labcycler Inventory number: 0004031/0004032</li></ul>
Chemicals and consumables	<ul style="list-style-type: none"><li>• DNA-polymerase, Buffer, MgCl<sub>2</sub>, Nucleotides</li><li>• Water (molecular grade)</li><li>• Autoclaved PCR tubes</li><li>• Autoclaved pipette tips</li></ul>





## N-HM Polymerase Chain Reaction

Life Sciences and  
Facility Management

Research Group EGSB

### 4 Procedure

1. PCR can be prepared on the personal workplace or in the PCR-benches.
2. Change your gloves often to minimize contamination of PCR.
3. All reagents, but especially enzymes, must be completely thawed on ice and kept there during the whole procedure.
4. Please refer to the individual DNA-polymerase protocols to design your PCR. These are only general guidelines: the optimal conditions, as well as the choice of the right DNA-polymerase, have to be determined case by case on the basis of the experimenter's requirements.
5. Users must save new PCR programs in a personal directory on the thermocycler. All changes in an existing program must be chronologically trackable (→ when updating a program please avoid overwriting the previous version, but rather save it under a new name).
6. Changing existing programs from others user is not allowed.
7. Avoid unnecessary overnight use of the thermocyclers.
8. After use turn off the thermocyclers.

(vormale SOP UI203)

(vormale SOP U203)

ErlassverantwortlicheR	Forschungsgruppe UGSB	Ablageort	Typo3 IUNR-UG_SB
Beschlussinstanz	LaborverantwortlicheR UGSB	Publikationsort	Staff

Version	Beschluss	Beschlussinstanz	Inkrafttreten	Beschreibung Änderung
1.0.0	10.03.2015	LaborverantwortlicheR UGSB	10.03.2015	Document creation (rezz)
				Transfer to GPM Documents, 08.03.2019
1.1.0				Dokumentenbezeichnung MB auf HM geändert, 06.03.2020 kre

Version: 1.1.0

gültig ab: 10.03.2015

Seite 2 von 2



# Anhang C: Produktdetails KAPA2G Robust DNA Polymerase (KAPABIOSYSTEMS)



Technical Data Sheet

## KAPA2G Robust HotStart ReadyMix PCR Kit

KR0381\_S – v2.17

### Product Description

KAPA2G Robust is a second-generation DNA polymerase engineered through a process of directed evolution. KAPA2G Robust was engineered for improved processivity and inhibitor tolerance, and offers significantly improved performance with challenging assays when compared to wild-type Taq DNA polymerase. In the HotStart formulation, the enzyme is combined with a proprietary antibody that inactivates the enzyme until the first denaturation step. This eliminates spurious amplification products resulting from nonspecific priming events during reaction setup and initiation, and increases overall reaction efficiency.

In the ReadyMix PCR Kit, KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase is supplied in a convenient 2X ReadyMix format, containing all reaction components except primers and template. The ReadyMix contains KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase (1 U per 25 µL reaction) in a proprietary reaction buffer containing dNTPs (0.2 mM of each dNTP at 1X), MgCl<sub>2</sub> (2 mM at 1X) and stabilizers. A ReadyMix with dye is also available – this contains two inert tracking dyes to enable direct loading of PCR products onto agarose gels for analysis by electrophoresis, without the need to add a DNA loading solution.

DNA fragments generated with KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase have the same characteristics as DNA fragments generated with wild-type Taq DNA polymerase, and may be used for routine downstream analyses or applications, including restriction enzyme digestion, cloning, and sequencing. Like wild-type Taq, KAPA2G Robust HotStart has 5'→3' polymerase and 5'→3' exonuclease activities, but no 3'→5' exonuclease (proofreading) activity. The fidelity of KAPA2G Robust HotStart is similar to that of wild-type Taq; it has an error rate of approximately 1 error per 1.7 × 10<sup>8</sup> nucleotides incorporated. PCR products generated by KAPA2G Robust HotStart are 3'-dA-tailed and may be cloned into TA cloning vectors.

### Product Applications

KAPA2G Robust HotStart ReadyMix is ideally suited for the amplification of DNA fragments <5 kb in standard end-point PCR assays from a wide variety of templates. They are particularly suited for:

- Assays which perform poorly with wild-type Taq
- Amplification of DNA fragments with high GC- or AT-content
- Amplification from template samples that contain PCR inhibitors (e.g. salts, urea, SDS, ethanol, EDTA) at concentrations that inhibit wild-type Taq
- Amplification from crude samples, e.g. colony PCR, or PCR from crude extracts, such as those prepared using KAPA Express Extract.

### Kit Codes and Components

<b>KK5701</b> (1.25 mL)	KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (2X) (contains 2 mM MgCl <sub>2</sub> at 1X)
<b>KK5702</b> (8.25 mL)	
<b>KK5704</b> (1.25 mL)	KAPA2G Robust HotStart ReadyMix with dye (2X) (contains 2 mM MgCl <sub>2</sub> at 1X)
<b>KK5705</b> (8.25 mL)	

### Quick Notes

- KAPA2G Robust HotStart ReadyMix PCR Kits contain an antibody-mediated hot-start formulation of KAPA2G Robust DNA Polymerase, engineered for high processivity and inhibitor tolerance.
- Both purified genomic DNA, and crude samples (e.g. colony PCR) can be used as template.
- Use 15 sec/kb extension time per cycle, and increase to 30–60 sec/kb for difficult amplicons or templates.
- KAPA2G Robust HotStart ReadyMix contains 2 mM MgCl<sub>2</sub> at 1X.
- KAPA2G Robust HotStart ReadyMix with dye includes two inert tracking dyes to allow direct loading onto agarose gels.
- KAPA2G Robust HotStart ReadyMix is ideal for single-protocol PCR, i.e. amplification of fragments varying from 25–85% GC, up to 1 kb in size, using a single reaction setup and cycling protocol.
- Reaction products are 3'-dA-tailed and may be cloned into TA cloning vectors.

In addition to these applications, KAPA2G Robust HotStart ReadyMix is also suitable for single-protocol PCR, which involves the amplification of DNA fragments <1 kb in size, with GC content varying from 25–85%. The addition of DMSO for amplicons above 65% GC enables amplification up to 85% GC. This allows consolidation of assays which typically require different reaction conditions and cycling protocols when amplified with wild-type DNA polymerases. For more information, please refer to the Single Protocol PCR Application Note, available from [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).

The KAPA2G Robust HotStart ReadyMix may be combined with KAPA Express Extract for fast and efficient DNA extraction and PCR. For more information, refer to the application notes for:

- Blood PCR
- Mammalian DNA barcoding
- Fish DNA barcoding
- FFPE PCR.

Effective date: September 2017

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

## KAPA2G Robust HotStart ReadyMix PCR Kit

## Technical Data Sheet

## Standard PCR Protocol

**IMPORTANT!** The KAPA2G Robust HotStart ReadyMix contains an engineered DNA polymerase and uniquely-formulated buffer, and requires specialized reaction conditions. If these conditions are not adhered to, reaction failure is likely. Refer to Important Parameters for more information.

## Step 1: Prepare the PCR master mix

- Ensure that all reagents are properly thawed and mixed.
- Prepare a PCR master mix containing the appropriate volume of all reaction components common to all or a subset of reactions to be performed.
- Calculate the required volumes of each component based on the following table:

Component	25 µL reaction <sup>1</sup>	Final conc.
PCR-grade water	Up to 25 µL	N/A
5X KAPA2G Robust HotStart ReadyMix <sup>2</sup>	12.5 µL	1X
100% DMSO (optional) <sup>3</sup>	1.25 µL	5%
10 µM Forward Primer	1.25 µL	0.5 µM
10 µM Reverse Primer	1.25 µL	0.5 µM
Template DNA <sup>4</sup>	As required	As required

<sup>1</sup> For volumes smaller than 25 µL, scale reagents down proportionally. Reaction volumes >25 µL are not recommended.

<sup>2</sup> KAPA2G Robust HotStart ReadyMix contains 2 mM MgCl<sub>2</sub> at 1X. Additional MgCl<sub>2</sub> may be added separately if required.

<sup>3</sup> For amplicons with a GC content >65%, supplement reactions with 5% DMSO.

<sup>4</sup> Use <100 ng genomic DNA (10–100 ng) and <1 ng less complex DNA (0.1–1 ng) per 25 µL reaction as first approach.

## Step 2: Set up individual reactions

- Transfer the appropriate volumes of PCR master mix, template and primer to individual PCR tubes or wells of a PCR plate.
- Cap or seal individual reactions, mix and centrifuge briefly.

## Step 3: Run the PCR

- Perform PCR with the following cycling protocol:

Step	Temperature	Duration	Cycles
Initial denaturation <sup>1</sup>	95°C	3 min	1
Denaturation	95°C	15 sec	30–40 <sup>4</sup>
Annealing <sup>2</sup>	55–65°C	15 sec	
Extension <sup>3</sup>	72°C	15–60 sec/kb	
Final extension	72°C	1 min/kb	1

<sup>1</sup> Initial denaturation for 3 min at 95°C is sufficient for most applications. Use 5 min at 95°C for GC-rich targets (>70% GC content).

<sup>2</sup> KAPA2G Robust HotStart ReadyMix is uniquely formulated to allow for use of a single annealing temperature for a wide range of primer lengths, GC contents and calculated melting temperatures. Use 60°C as a first approach, and adjust only if necessary.

<sup>3</sup> Use 15 sec extension per cycle for targets ≤1 kb, and 30–60 sec/kb for longer fragments, or to improve yields.

<sup>4</sup> The number of cycles required is dependent on the size of the amplicon, and the amount of template copies per reaction. A 35-cycle PCR can typically amplify a high yield of product from 100 copies of template. For crude samples, higher cycle numbers may be required.

## Product Specifications

## Shipping, storage and handling

KAPA2G Robust HotStart ReadyMix PCR Kits are shipped on dry ice or ice packs, depending on the country of destination. Upon arrival, store kit components at -15°C to -25°C in a constant-temperature freezer. When stored under these conditions and handled correctly, full activity of the kit is retained until the expiry date indicated on the kit label. The ReadyMix contains isostabilizers and may not freeze solidly, even when stored at -15°C to -25°C. This will not affect the shelf-life of the product.

Always ensure that the product has been fully thawed and mixed before use. Reagents may be stored at 2°C to 8°C for short-term use (up to 1 month). Return to -15°C to -25°C for long-term storage. Provided that all components have been handled carefully and not contaminated, the kit is not expected to be compromised if left (unintentionally) at room temperature for a short period of time (up to 3 days). Long-term storage at room temperature and 2°C to 8°C is not recommended. Please note that reagents stored at temperatures above -15°C to -25°C are more prone to degradation when contaminated during use, and therefore storage at such temperatures is at the user's own risk.

## Quality control

Each batch of KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase is confirmed to contain <2% contaminating protein (Agilent Protein 230 Assay). KAPA2G Robust HotStart ReadyMix PCR Kits are subjected to stringent quality control tests, are free of contaminating exo- and endonuclease activity, and meet strict requirements with respect to DNA contamination levels.

## KAPA2G Robust HotStart ReadyMix PCR Kit

## Technical Data Sheet

### Important Parameters

#### Cycling protocol

KAPA2G Robust HotStart is a highly processive DNA polymerase, capable of amplifying DNA fragments of up to 1 kb in size with a 15 sec/cycle extension time. The use of excessive extension times is likely to result in smearing and nonspecific amplification. For amplicons <1 kb with genomic DNA as template, 15 sec per cycle should be sufficient for a high yield of product. In the case of longer amplicons, the time may be increased to a maximum of 60 sec/kb, in 15 sec increments.

Assays that are likely to require longer extension times include extremely GC-rich targets (>75% GC), as well as amplification from crude samples, or template samples that are contaminated with inhibitors. Should the initial assay with a 15 sec/kb extension time produce low yields or no product at all, the extension time may be increased to a maximum of 60 sec/kb, in 15 sec increments. Note that if amplification fails completely, annealing temperature optimization is likely to be required.

In addition to extension time, the annealing time is critical to ensure success. KAPA2G Robust HotStart has much higher activity than wild-type *Taq* at temperatures typically used for annealing (~60°C), so the use of excessive annealing times often results in the same effects as excessive extension times. Typically, the formation of nonspecific products that are larger than the target band indicates that the annealing time used is too long.

The number of cycles to use is dependent on the number of template copies present at the beginning of the reaction. For routine applications, 35 cycles is sufficient for a high yield of product. However, if the template DNA contains a high number of copies, cycle numbers may be reduced accordingly.

#### Annealing temperature

Generally, an annealing temperature of 60°C produces good results with KAPA2G Robust HotStart. Use 55°C for primers with calculated  $T_m$  of <55°C, 60°C for primers with calculated  $T_m$  of 55–65°C, and 65°C for primers with calculated  $T_m$  above 65°C. If necessary, optimize annealing temperatures with gradient PCR or adjust annealing temperatures as follows:

- If a low yield of only the specific product is obtained, lower the annealing temperature in 2°C increments.
- If nonspecific products are formed in addition to the specific product, increase the annealing temperature in 2°C increments.
- If no product is formed (specific or nonspecific), reduce the annealing temperature by 5°C. If primers are highly AT-rich,  $MgCl_2$  concentration may have to be increased.
- If only nonspecific products are formed (in a ladder-like pattern), increase the annealing temperature by 5°C or try recommendations for GC-rich PCR (see Important Parameters: GC-rich PCR).

### Primers

Primers should be designed to eliminate the possibility of primer-dimer formation and nonspecific annealing, and should have a GC content of 40–60%. Primers with a GC content >60% may require higher denaturation temperatures and/or longer denaturation times, while primers with a GC content <40% may require annealing temperatures <60°C, and/or increased  $MgCl_2$  and primer concentrations. Furthermore, primer sets should be designed to have similar theoretical melting temperatures.

**NOTE:** Always dilute and store primers in a buffered solution (e.g. 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 – 8.5) instead of PCR-grade water to limit degradation and maintain primer quality.

#### $MgCl_2$ concentration

KAPA2G Robust HotStart ReadyMix contains 2 mM  $MgCl_2$  at 1X, which is sufficient for most applications. Longer amplicons (>2 kb) and AT-rich PCR, as well as amplification using primers with a low GC content (<40%), are likely to require additional  $MgCl_2$ .

#### GC-rich PCR

For GC-rich amplicons (>65% GC content), supplement reactions with 5% DMSO. Should this not result in successful amplification, use the KAPA2G Robust (HotStart) PCR Kits, according to the recommendations in the Routine GC-rich PCR Application Note available from [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).



**KAPA2G Robust HotStart ReadyMix PCR Kit****Technical Data Sheet****Troubleshooting**

Symptoms	Possible causes	Solutions
No amplification or low yield	Cycling protocol	Increase the extension time to a maximum of 60 sec/kb (in 15 sec increments). Increase the number of cycles.
	Annealing temperature is too high	Reduce the annealing temperature by 5°C. Optimize the annealing temperature by gradient PCR.
	Template DNA quantity and quality	Excess template DNA chelates Mg <sup>2+</sup> . Either reduce the template concentration to <100 ng, or increase MgCl <sub>2</sub> . Check template DNA quality. Store and dilute in a buffered solution, not water. Template may contain inhibitors. Perform dilution series PCR to determine optimal template concentration.
	Primer concentration	Some primers anneal more efficiently than others. Increase the primer concentration, or optimize MgCl <sub>2</sub> to improve primer binding. Store and dilute primers in a buffered solution, not water.
	MgCl <sub>2</sub>	Optimize MgCl <sub>2</sub> concentration. AT-rich PCR typically requires more MgCl <sub>2</sub> .
Nonspecific amplification or smearing	Template DNA	Use <100 ng of DNA per reaction, or reduce the number of cycles. Check template DNA quality.
	Cycling protocol	Excessive annealing and/or extension times will result in nonspecific amplification, typically of bands larger than the target band. Reduce the annealing and extension times to a minimum of 10 sec each.  If you are using a slow-ramping cycler (<3°C/sec heating/cooling rate), reduce the denaturation and annealing times to 10 sec each, with 10 sec extension per cycle.
	Annealing temperature is too low	A sub-optimal annealing temperature will result in nonspecific amplicons that are typically smaller than the target band. See Important Parameters: Annealing Temperature.
	High target GC content	Supplement reactions with 5% DMSO (amplicons with >85% GC).
	Primer concentration	Some primers anneal more efficiently than others. Decrease the primer concentration.  Store and dilute primers in a buffered solution, not water.



Manufacturing, R&D  
Cape Town, South Africa  
Tel: +27.21.448.8200  
Fax: +27.21.448.6503

Technical Support  
[sigma-aldrich.com/techservice](mailto:sigma-aldrich.com/techservice)

© 2017 KAPA is a trademark of Roche. All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

## Anhang D: Produktdetails Nematoden Primers (Microsynth)

**Microsynth****Technical Datasheet**

Order Id 672667

Order Date 12.03.2020

**pN\_268\_r**

Oligo Id 3714296

Type	DNA	Synthesis scale	Genomics	Molecular weight	6372.1 g/mol	Amount	9.92 OD
5' Modification	NONE	Purification	Desalted	Ext. coefficient	192.4 l/(mm-cm)		51.6 nmol
3' Modification	NONE	Length	21 nt	Tm (50 mM NaCl)	59.5 °C		328.5 µg
No internal modifications				Tm (NN-Method)	53.3 °C	Volume for 100 µM	515.5 µl
5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3'							

**pXb\_101\_f**

Oligo Id 3714297

Type	DNA	Synthesis scale	Genomics	Molecular weight	6314.1 g/mol	Amount	10.61 OD
5' Modification	NONE	Purification	Desalted	Ext. coefficient	176.6 l/(mm-cm)		60.1 nmol
3' Modification	NONE	Length	21 nt	Tm (50 mM NaCl)	59.5 °C		379.4 µg
No internal modifications				Tm (NN-Method)	53.2 °C	Volume for 100 µM	600.8 µl
5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3'							

## Anhang E: ZHAW SOP Gelelektrophorese

### N-HM DNA gel electrophoresis

Zürcher Hochschule  
für Angewandte Wissenschaften



Life Sciences and  
Facility Management

Research Group EGSB

### DNA gel electrophoresis

#### 1 General Info

Object / Project	BioRad gel electrophoresis system
Purpose	This SOP describes the handling of the BioRad gel electrophoresis system
Area of application	Institute for Natural Resource Sciences, Lab RT244
Further applicable documents	<ul style="list-style-type: none"><li>• N_HM Laboratory regulations EGSB</li><li>• Methodensammlung UGEB</li><li>• User handbooks</li><li>• Green M.R. and Sambrook, J. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.</li><li>• Product information sheets</li><li>• Libreja -&gt; Equipment specifications and PDF-manuals</li><li>• List of chemicals -&gt; Moodle</li><li>• N-MB Gel Documentation</li></ul>

#### 2 Definitions and safety recommendations

- GelRed is used as less toxic alternative to Ethidiumbromide, nevertheless the complete **harmlessness of GelRed was never demonstrated beyond any doubt**. Wear a lab coat and nitrile gloves at all times!
- The area for working with GelRed is delimited by yellow-black tape ("GelRed area"). GelRed contaminations outside the area reserved for gel electrophoresis must be absolutely avoided => change or dispose your gloves when leaving the marked area.
- For pipetting the probes into the gel use exclusively the set of pipettes reserved for this purpose (designated by the red dot).
- Recommendations for handling chemicals are described in the respective material safety data sheets (MSDS) and must be followed scrupulously.
- After use clean the combs, flasks, tray and UV-table with water or ethanol.

**N-HM DNA gel electrophoresis****3 Material**

Table 1: Material for gel electrophoresis

Microvawe oven	Intertronic Inventory number: 0004077
Power supply	BioRad Power Pac Basic Inventory number: 0004074/0004075.
Elektrophoresis chambers	(01) Bio-Rad Mini-Sub Cell GT (Gel=7x10 cm → 40-50 ml); (02) Bio-Rad WideMini-Sub Cell GT (Gel=15x10 cm → 80-150 ml); (03/04) Sub-Cell GT (15x10cm to 15x25 cm → 150-200 ml)
Chemicals and consumables	Agarose, 1x TAE or TBE Buffer, 1000x GelRed, Orange G loading buffer, DNA ladder
Material in the GelRed area	Schott-flask, nitrile gloves, heat-protection gloves, safety glasses, safety UV face shield

**4 Procedure**

All electrophoresis steps are thoroughly described in Green and Sambrook (2012).

1. Weigh the necessary agarose amount in a Schott-flask of the appropriate volume.
2. Add the needed volume of TAE or TBE buffer to agarose
3. Heat in the microwave at maximum power (without lid!), swing the solution around few times until completely dissolved (2-3 minutes). No agar particles must remain visible.
4. Cool to approximately 60°C and add the appropriate amount of 1000x GelRed stock.
5. Once that the gel has solidified (> 30 min) it is ready to be loaded with the samples and the DNA ladder as a size marker.
6. Preparation of the samples is performed by mixing the PCR reaction with 1/5 volumes of Orange G loading buffer(if necessary, depends on the polymerase). Whenever possible, prepare the samples outside the electrophoresis area. Avoid contaminating other pipettes (e.g., multi-channel) with gloves that may have been in contact with GelRed.
7. Load the Gel into chamber and be sure that the TAE covers the Gel completely.
8. For pipetting the samples into the gel use the designated set of pipettes only (designated by the red dot) and the corresponding tips.
9. Electrophoresis must be carried out at max. 20 V/cm gel length.
10. For gel imaging please refer to Gel Documentation

**N-HM DNA gel electrophoresis**



**Life Sciences and  
Facility Management**

Research Group EGSB

(vormals SOP UI204)

ErlassverantwortlicheR		Forschungsgruppe UGSB	Ablageort	Typo3 IUNR-UG_SB
Beschlussinstanz		LaborverantwortlicheR UGSB	Publikationsort	Staff
Version	Beschluss	Beschlussinstanz	Inkrafttreten	Beschreibung Änderung
1.0.0	10.03.2015	LaborverantwortlicheR UGSB	10.03.2015	Document creation (rezz) Transfer to GPM Documents, 08.03.2019
2.0.0	26.04.2019	LaborverantwortlicheR UGSB	26.04.2019	Revised document (pama)
2.1.0				Dokumentenbezeichnung MB auf HM geändert, 06.03.2020 kres

Version: 2.1.0

gültig ab: 26.04.2019

Seite 3 von 3



## Anhang F: ZHAW SOP Gel Evaluation

### N-HM Gel Documentation

Zürcher Hochschule  
für Angewandte Wissenschaften



Life Sciences and  
Facility Management

Research Group EGSB

### Gel Documentation

#### 1 General Info

Object / Project	E-BOX VX5 gel documentation system
Purpose	This SOP describes the usage of the E-BOX VX5 gel documentation system
Area of application	Institute for Natural Resource Sciences, Lab RT244
Further applicable documents	<ul style="list-style-type: none"><li>• N-HM Laboratory regulations EGSB</li><li>• Methodensammlung UGSB</li><li>• E-BOX VX5 user handbook</li><li>• Green M.R. and Sambrook, J. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.</li><li>• Libreja -&gt; Equipment specifications and PDF-manuals</li><li>• N-MB Gel electrophoresis</li></ul>

#### 2 Definitions and safety recommendations

- GelRed is used as less toxic alternative to Ethidiumbromide, nevertheless the complete **harmlessness of GelRed was never demonstrated beyond any doubt**. Wear a lab coat and nitrile gloves at all times!
- The area for working with GelRed is delimited by yellow-black tape. GelRed contaminations outside the area reserved for gel electrophoresis must be absolutely avoided => change or dispose your gloves when leaving the marked area.
- Recommendations for handling chemicals are described in the respective material safety data sheets (MSDS) and must be followed scrupulously.
- After use clean the UV-table with water or ethanol

#### 3 Material

Table 1: Material for Gel Imaging

Instrument	E-BOX VX5 gel documentation system Inventory number: 0004076
Protection	Nitrile gloves, UV-glass, safety glasses, safety UV face shield

## N-HM Gel Documentation



## Life Sciences and Facility Management

Research Group EGSB

### 4 Procedure

1. Take all the required steps to minimize GelRed contaminations to the outer surfaces of the gel documentation system: open the cabinet before removing the gel from the electrophoresis tank and change gloves if needed.
2. After the electrophoresis run, carefully remove the tray with your gel from the tank, dry it on the underside with a tissue and place it in the gel documentation system cabinet.
3. Image acquisition procedures are described in the E-BOX VX5 handbook.
4. For data transfer, utilize only the dedicated data storage units (USB sticks) that can be obtained from the laboratory manager. Avoid contaminating the USB stick using gloves that may have been in contact with GelRed.
5. Once a satisfactory image has been acquired dispose the gel in the dedicated special trash bin identified by the GHS pictogram below.



GHS warning pictogram for hazardous substances

6. Turn off the instrument after use or if you do not immediately plan to use it again.
7. In case that you need to keep the instrument on be sure to switch off the UV light to avoid overheating.
8. If you need to excise DNA bands from the gel under UV-light work swiftly and wear full protective clothing: including UV face shield, lab coat and gloves. Make sure all exposed skin (wrists, neck) is covered.

(vormals SOP UI205)

ErlassverantwortlicheR		Forschungsgruppe UGSB		Ablageort	Typo3 IUNR-UG_SB
Beschlussinstanz		LaborverantwortlicheR UGSB		Publikationsort	Staff
Version	Beschluss	Beschlussinstanz	Inkrafttreten	Beschreibung Änderung	
1.0.0	10.03.2015	LaborverantwortlicheR UGSB	10.03.2015	Document creation (rezz)	
				Transfer to GPM Documents, 08.03.2019	
1.1.0				Dokumentenbezeichnung MB auf HM geändert, 06.03.2020 kres	

Version: 1.1.0

gültig ab: 10.03.2015

Seite 2 von 2

**Anhang G: Rohdaten Nematodenisolation und -reinfektion**

Number	Isolated	Reinfection 1	Reinfection 2		PCR Num	PCR Result Isolated	PCR Result Reinfection
1.2.2-2	14.11.2019				229	NA	
1.3.1-1	14.11.2019				59, 228	NA	NA
1.3.1-2	23.12.2019		11.03.2020		1, 227, 23	Oscheius sp.	Oscheius sp./NA
1.3.2	14.11.2019				225	NA	
1.3.3	14.11.2019				226	Oscheius sp.	
1.4.1	14.11.2019				224	NA	
2.1.2	17.02.2020				214, 243	NA	
2.2.1-1	17.02.2020				220	NA	
2.2.2	17.02.2020				219	NA	
2.3.1	17.02.2020	16.03.2020			2, 217, 24	NA	NA
2.3.3-1	17.02.2020				218	NA	
2.3.3-2	17.02.2020	13.03.2020			61, 216, 2	NA	/Diplogasteroides sp.
2.4.1	17.02.2020				223	NA	
2.4.2	17.02.2020				221	NA	
2.4.3	17.02.2020	10.03.2020			3, 222, 24	Diplogasteroides sp./NA	NA
2.4.3-1-2		10.03.2020			39		NA
2.5.1	17.02.2020				215	NA	
3.1.1-1	17.02.2020				171	NA	
3.1.1-2	17.02.2020				172	NA	
3.1.2	17.02.2020				173	NA	
3.1.3-1	17.02.2020	13.03.2020			4, 174, 234	Diplogasteroides sp.	NA
3.1.3-2	17.02.2020				175	NA	
4.1.1-1	17.02.2020	10.03.2020			49, 202	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
4.1.1-2		13.03.2020			26, 203	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
4.1.1-2-2	17.02.2020	10.03.2020			52		Steinernema feltiae
4.1.1-1-3		10.03.2020			5		Steinernema feltiae
4.1.2-1-1		13.03.2020			55, 201	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
4.1.2-1-2	17.02.2020	13.03.2020			80		Steinernema feltiae
4.2.2	17.02.2020				204	Pristionchus sp.	
4.2.3-1	17.02.2020				206	NA	
4.2.3-2	17.02.2020				205	NA	
4.3.1-1-1		11.03.2020			77, 209	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
4.3.1-1-2	17.02.2020	11.03.2020			29		Steinernema feltiae
4.3.3-1-1		11.03.2020			62, 208	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
4.3.3-1-2	17.02.2020	11.03.2020			31		Steinernema feltiae
4.3.3-2	17.02.2020	11.03.2020			7, 210	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
4.4.1-1	17.02.2020	10.03.2020			8, 235		Cruznema sp./Steinernema feltiae
4.4.2-1-1	17.02.2020	11.03.2020			47, 213	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
4.4.2-1-2		11.03.2020			57		Steinernema feltiae
4.4.2-2		11.03.2020			88		NA
4.4.2-2	17.02.2020	13.03.2020			212		Pristionchus entomophagus
4.4.3	17.02.2020				211, 244	Diplogasteroides sp.	
5.1.2-1	03.02.2020				176	NA	
5.1.2-2	03.02.2020				177	Oscheius sp.	
5.1.3	03.02.2020				178	NA	
5.2.2	03.02.2020				179	NA	
6.1.1	03.02.2020				199	NA	
6.1.2-1	03.02.2020				197	NA	
6.1.2-2	03.02.2020				198	NA	
6.1.3	03.02.2020				200	Oscheius sp.	
7.1.2-1	23.12.2019				166	Cruznema sp.	
7.2.1-2	20.12.2019	13.03.2020			9, 160		Oscheius sp.
7.2.2-1	20.12.2019				167	Cruznema sp.	
7.2.3-1	23.12.2019	13.03.2020			53, 164	Cruznema sp./NA	Cruznema sp.
7.2.b	23.12.2019				170	Cruznema sp.	
7.3.1	23.12.2019				168	NA	

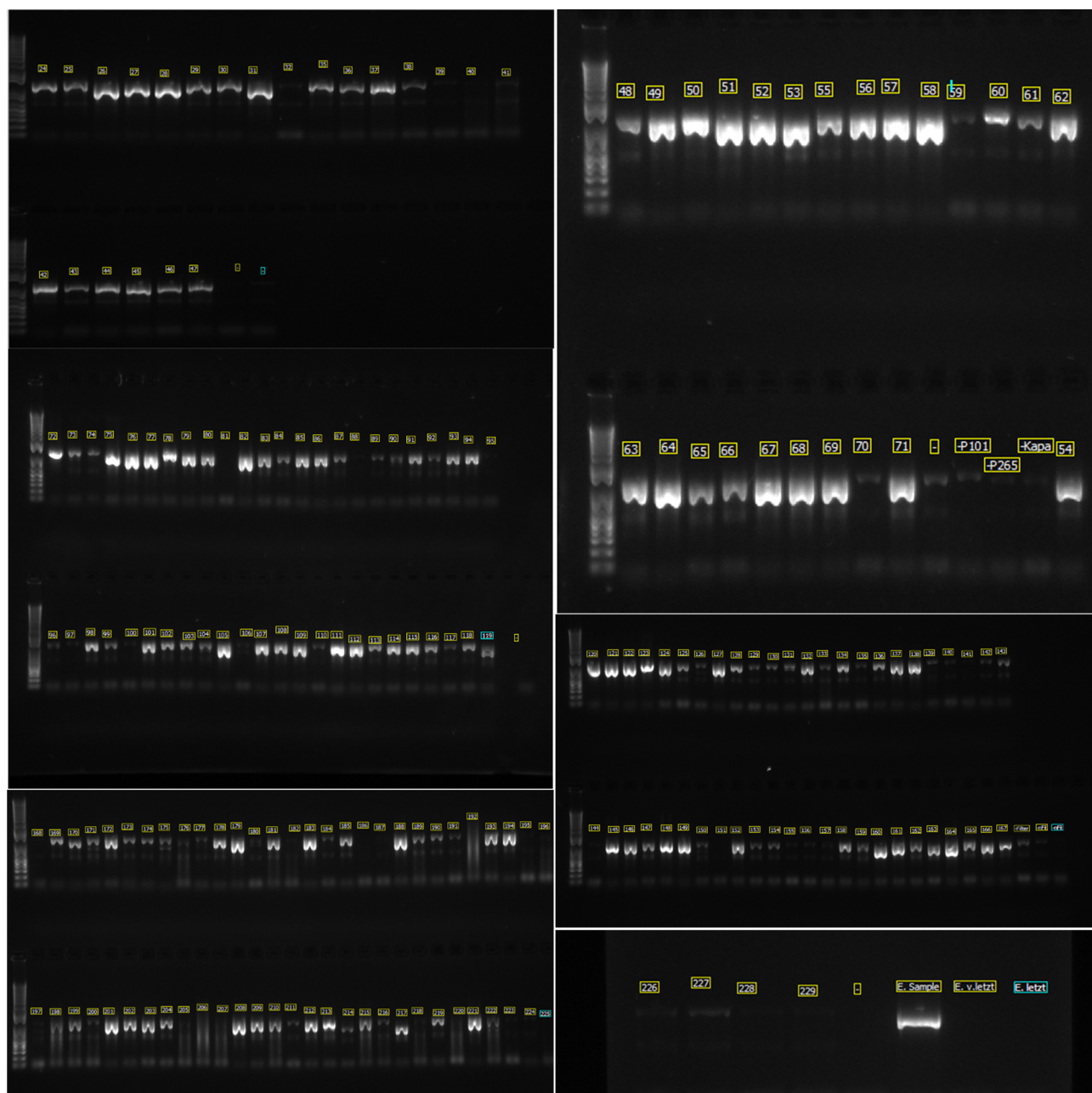
Number	Isolated	Reinfection 1	Reinfection 2		PCR Num	PCR Result Isolated	PCR Result Reinfection
7.3.2	20.12.2019				163	Cruznema sp.	
7.3.3	23.12.2019				169	Pristionchus sp.	
7.4.1	23.12.2019				79, 165	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
7.4.2	23.12.2019	20.01.2020	11.03.2020		10, 78, 161	Steinernema feltiae	Oscheius sp.
7.4.3	23.12.2019				161	NA	
9.2.3	23.12.2019				158	Pristionchus entomophagus	
9.4.1-1	20.12.2019	09.03.2020			11, 33, 154	NA	Steinernema feltiae
10.3.2-1	23.12.2019	23.12.2019			155		NA
10.3.2-2	20.12.2019				60, 157	NA	Oscheius myriophilus
10.3.3	23.12.2019				156	NA	
11.1.1-1	07.01.2020	09.03.2020			24, 153	NA	Oscheius myriophilus
11.1.1-2	07.01.2020				154	Steinernema feltiae	
11.1.2-1-1		11.03.2020			44, 149	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
11.1.2-1-2	07.01.2020	11.03.2020			43		Steinernema feltiae
11.1.2-2-1		11.03.2020			85, 148	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
11.1.2-2-2	07.01.2020	11.03.2020			12		Steinernema feltiae
11.1.3-1-1		11.03.2020			38, 152	NA	Steinernema feltiae
11.1.3-1-2	08.01.2020	11.03.2020			40		NA
11.2.2	07.01.2020				150	NA	
11.3.2	07.01.2020				151	NA	
12.1.3	08.01.2020				193	NA	
12.2.1-1	08.01.2020				196	NA	
12.2.1-2	08.01.2020				195	NA	
12.2.3-1	08.01.2020				194	NA	
12.2.3-2	08.01.2020	13.03.2020			50, 143, 145	NA	Steinernema feltiae
13.1.1-3	07.01.2020				142	NA	
13.1.2-1	07.01.2020				144	NA	
13.1.2-2	07.01.2020	10.03.2020			48, 139	NA	Steinernema feltiae
13.1.2-4	07.01.2020				136, 239	Pristionchus sp.	
13.1.3-5	08.01.2020				141	NA	
13.2.1-1	07.01.2020	10.03.2020			13, 137	Steinernema feltiae	NA
13.2.1-2	07.01.2020	10.03.2020			51, 138	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
13.2.1-1-3		10.03.2020			37		Steinernema feltiae
13.2.2-1	07.01.2020				147	Steinernema feltiae	
13.2.2-2	07.01.2020				146	NA	
13.2.3-1	07.01.2020	13.03.2020			54, 145	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
13.2.3-1-2		10.03.2020			83		Steinernema feltiae/NA
13.2.3-2-1		11.03.2020			28		Steinernema feltiae
13.2.3-2-2	07.01.2020	11.03.2020			27		Steinernema feltiae
14.2.1-1-1		11.03.2020			41, 135	NA	NA
14.2.1-1-2	07.01.2020	11.03.2020			56		Oscheius myriophilus
14.2.3	07.01.2020	11.03.2020			14, 133	NA	Oscheius sp.
14.3.1	07.01.2020				134		
14.3.3	07.01.2020				132		
14.4.2-1	08.01.2020	13.03.2020			32, 131		
15.1.1-2	07.01.2020	13.03.2020			15, 126	NA	NA
15.2.3	07.01.2020				128	NA	
15.3.2-2	07.01.2020				127	NA	
15.3.2-3	07.01.2020				130	NA	
15.3.2-4	07.01.2020				129	NA	
16.1.1-1	03.02.2020				125	NA	
16.1.1-2	03.02.2020				124	NA	
16.1.1-3	03.02.2020	11.03.2020			16, 119, 23	NA	Diplogasteroides sp./NA
16.1.2	03.02.2020				117	NA	
16.2.1-1	03.02.2020	11.03.2020			25, 123	NA	Oscheius sp.
16.2.1-2	03.02.2020				121	NA	
16.2.1-3	03.02.2020	11.03.2020			89, 122	NA	NA
16.2.2-1	03.02.2020	11.03.2020			6, 116	NA	Steinernema carpocapsae
16.2.2-2	03.02.2020				118	NA	

Number	Isolated	Reinfection 1	Reinfection 2		PCR Num	PCR Result Isolated	PCR Result Reinfection
16.2.2-3	03.02.2020				120	NA	
17.1.3	03.02.2020				182	NA	
19.1.1-1	03.02.2020				181	NA	
19.1.1-2	03.02.2020				184	Oscheius sp.	
19.2.2	03.02.2020				183	NA	
20.1.1		10.03.2020			45, 189	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
20.1.1-1-2	03.02.2020	10.03.2020			42		Steinernema feltiae
20.1.2-1	03.02.2020	10.03.2020			17, 36, 188	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
20.1.2-2		10.03.2020			86, 190	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
20.1.2-2-2	03.02.2020				87	Steinernema feltiae	
20.2.1-1	03.02.2020				186	NA	
20.2.1-2	03.02.2020				187	NA	
20.2.2	03.02.1930				180	NA	
20.2.3-2	03.02.2020				185	NA	
20.2.3-1	03.02.2020				191	NA	
21.1.1-1	03.02.2020	10.03.2020			71	NA	
21.1.1-2	03.02.2020				69	NA	
21.1.1-3	03.02.2020				65, 229	Diplogasteroides sp./NA	
21.1.3-1	03.02.2020				72	NA	
21.1.3-2	03.02.2020				76	NA	
21.1.3-3	03.02.2020				64	NA	
21.1.2	03.02.2020				67	NA	
21.2.1-1	03.02.2020				63	Oscheius sp.	
21.2.1-2	03.02.2020				73	Oscheius sp.	
21.2.1-3	03.02.2020				70	NA	
21.2.2-1	03.02.2020				75	NA	
21.2.2-2	03.02.2020				74, 238	NA	
21.2.2-3	03.02.2020				68, 237	NA	
21.2.3	03.02.2020				66, 230	Diplogasteroides sp./NA	
22.1.1	03.02.2020	10.03.2020			18, 91	NA	Oscheius sp.
22.2.1	03.02.2020				90	NA	
22.2.3	03.02.2020	10.03.2020			19, 92	NA	Steinernema feltiae
23.1.1-3	03.02.2020				109	NA	
23.1.1-4	03.02.2020				108	NA	
23.2.1-1	03.02.2020				111	NA	
23.2.1-2		10.03.2020			58, 107	NA	Steinernema feltiae
23.2.1-2-1	03.02.2020	10.03.2020			84		Steinernema feltiae
23.2.2-1	03.02.2020				110	NA	
23.2.2-2	03.02.2020	13.03.2020			20, 114	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
23.2.3-1	03.02.2020				115	NA	
23.2.3-2	03.02.2020				112	NA	
23.2.3-3	03.02.2020				113	NA	
24.1.2-1	17.02.2020				99	NA	
24.1.2-2	17.02.2020	13.03.2020			21, 103	Steinernema feltiae	Steinernema feltiae
24.1.3	17.02.2020				102	NA	
24.2.1-1		10.03.2020			30, 105	NA	Oscheius tipulae
24.2.1-1-3	17.02.2020	10.03.2020			22		Steinernema feltiae/NA
24.2.1-2	17.02.2020	10.03.2020			35, 100	NA	Oscheius tipulae
24.2.2	17.02.2020	15.03.2020			81,101	NA	NA
24.3.1-1	17.02.2020				104, 231	NA	
24.3.1-2	17.02.2020				106	NA	
24.3.3-2		11.03.2020			46		Steinernema feltiae
25.1.1-1	17.02.2020				98	NA	
25.1.1-2		10.03.2020			23, 34, 93	NA	Steinernema feltiae
25.1.1-2-1	17.02.2020	10.03.2020			82, 236		NA
25.2.1	17.02.2020				97	NA	
25.3.1-1	17.02.2020				94	Pristionchus sp	
25.3.1-2	17.02.2020				95	NA	
25.3.1-3	17.02.2020				96	NA	

Erste Ziffer von Spalte «Number» definiert den Standort (siehe Tabelle 4); Zahlen aus PCR Numb. betreffen Sequenzierungsergebnisse aus Tabelle 5.; Rot=keine Nematode; Blau=Wiederholungen; Grün=entomopathogene Nematoden für Biotests; Orange=unklar → Wiederholungen.



## Anhang H: Gelbilder der isolierten nematodenähnlichen Organismen

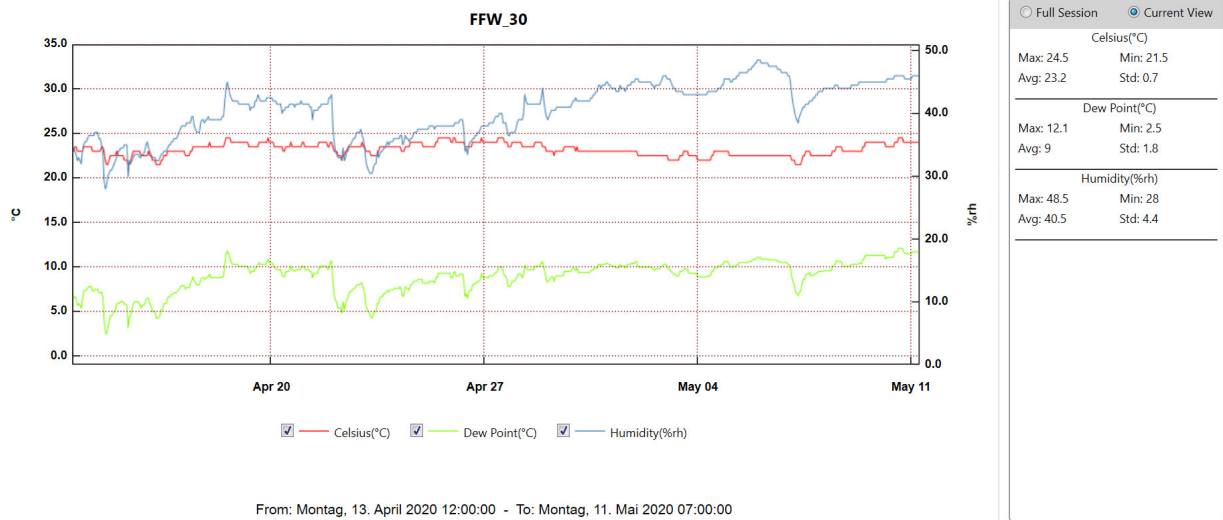


## Anhang I: Beispiel Sequenzierungstabelle für Microsynth

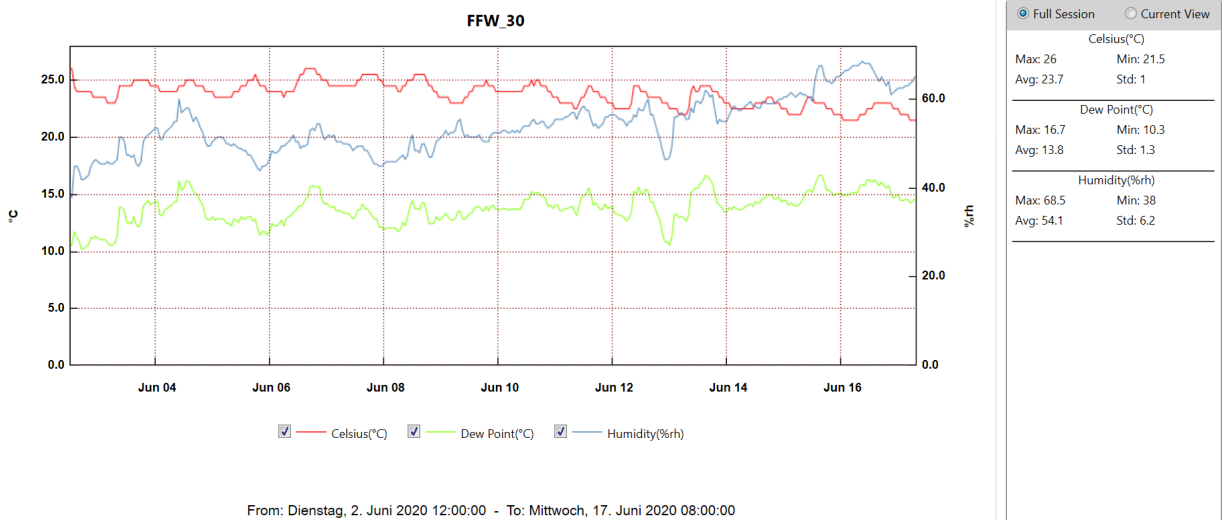
pXb_101	f	r	48	pXb_101 f	pN_26S	f	r	48	pN_26S r
pXb_101	f	r	49	pXb_101 f	pN_26S	f	r	49	pN_26S r
pXb_101	f	r	50	pXb_101 f	pN_26S	f	r	50	pN_26S r
pXb_101	f	r	51	pXb_101 f	pN_26S	f	r	51	pN_26S r
pXb_101	f	r	52	pXb_101 f	pN_26S	f	r	52	pN_26S r
pXb_101	f	r	53	pXb_101 f	pN_26S	f	r	53	pN_26S r
pXb_101	f	r	54	pXb_101 f	pN_26S	f	r	54	pN_26S r
pXb_101	f	r	55	pXb_101 f	pN_26S	f	r	55	pN_26S r
pXb_101	f	r	56	pXb_101 f	pN_26S	f	r	56	pN_26S r
pXb_101	f	r	57	pXb_101 f	pN_26S	f	r	57	pN_26S r
pXb_101	f	r	58	pXb_101 f	pN_26S	f	r	58	pN_26S r
pXb_101	f	r	60	pXb_101 f	pN_26S	f	r	60	pN_26S r
pXb_101	f	r	61	pXb_101 f	pN_26S	f	r	61	pN_26S r
pXb_101	f	r	62	pXb_101 f	pN_26S	f	r	62	pN_26S r
pXb_101	f	r	63	pXb_101 f	pN_26S	f	r	63	pN_26S r
pXb_101	f	r	64	pXb_101 f	pN_26S	f	r	64	pN_26S r
pXb_101	f	r	65	pXb_101 f	pN_26S	f	r	65	pN_26S r
pXb_101	f	r	66	pXb_101 f	pN_26S	f	r	66	pN_26S r
pXb_101	f	r	67	pXb_101 f	pN_26S	f	r	67	pN_26S r
pXb_101	f	r	68	pXb_101 f	pN_26S	f	r	68	pN_26S r
pXb_101	f	r	69	pXb_101 f	pN_26S	f	r	69	pN_26S r
pXb_101	f	r	71	pXb_101 f	pN_26S	f	r	71	pN_26S r
pXb_101	f	r	-	pXb_101 f	pN_26S	f	r	-	pN_26S r
pXb_101	f	r	72	pXb_101 f	pN_26S	f	r	72	pN_26S r
pXb_101	f	r	73	pXb_101 f	pN_26S	f	r	73	pN_26S r
pXb_101	f	r	74	pXb_101 f	pN_26S	f	r	74	pN_26S r
pXb_101	f	r	75	pXb_101 f	pN_26S	f	r	75	pN_26S r
pXb_101	f	r	76	pXb_101 f	pN_26S	f	r	76	pN_26S r
pXb_101	f	r	77	pXb_101 f	pN_26S	f	r	77	pN_26S r
pXb_101	f	r	78	pXb_101 f	pN_26S	f	r	78	pN_26S r
pXb_101	f	r	79	pXb_101 f	pN_26S	f	r	79	pN_26S r
pXb_101	f	r	80	pXb_101 f	pN_26S	f	r	80	pN_26S r
pXb_101	f	r	82	pXb_101 f	pN_26S	f	r	82	pN_26S r
pXb_101	f	r	83	pXb_101 f	pN_26S	f	r	83	pN_26S r
pXb_101	f	r	84	pXb_101 f	pN_26S	f	r	84	pN_26S r
pXb_101	f	r	85	pXb_101 f	pN_26S	f	r	85	pN_26S r
pXb_101	f	r	86	pXb_101 f	pN_26S	f	r	86	pN_26S r
pXb_101	f	r	87	pXb_101 f	pN_26S	f	r	87	pN_26S r
pXb_101	f	r	91	pXb_101 f	pN_26S	f	r	91	pN_26S r
pXb_101	f	r	93	pXb_101 f	pN_26S	f	r	93	pN_26S r
pXb_101	f	r	94	pXb_101 f	pN_26S	f	r	94	pN_26S r
pXb_101	f	r	98	pXb_101 f	pN_26S	f	r	98	pN_26S r
pXb_101	f	r	99	pXb_101 f	pN_26S	f	r	99	pN_26S r
pXb_101	f	r	101	pXb_101 f	pN_26S	f	r	101	pN_26S r
pXb_101	f	r	102	pXb_101 f	pN_26S	f	r	102	pN_26S r
pXb_101	f	r	103	pXb_101 f	pN_26S	f	r	103	pN_26S r
pXb_101	f	r	104	pXb_101 f	pN_26S	f	r	104	pN_26S r
pXb_101	f	r	105	pXb_101 f	pN_26S	f	r	105	pN_26S r
pXb_101	f	r	107	pXb_101 f	pN_26S	f	r	107	pN_26S r
pXb_101	f	r	108	pXb_101 f	pN_26S	f	r	108	pN_26S r
pXb_101	f	r	109	pXb_101 f	pN_26S	f	r	109	pN_26S r
pXb_101	f	r	111	pXb_101 f	pN_26S	f	r	111	pN_26S r
pXb_101	f	r	112	pXb_101 f	pN_26S	f	r	112	pN_26S r
pXb_101	f	r	113	pXb_101 f	pN_26S	f	r	113	pN_26S r
pXb_101	f	r	114	pXb_101 f	pN_26S	f	r	114	pN_26S r
pXb_101	f	r	115	pXb_101 f	pN_26S	f	r	115	pN_26S r
pXb_101	f	r	116	pXb_101 f	pN_26S	f	r	116	pN_26S r
pXb_101	f	r	118	pXb_101 f	pN_26S	f	r	118	pN_26S r
pXb_101	f	r	119	pXb_101 f	pN_26S	f	r	119	pN_26S r
pXb_101	f	r	120	pXb_101 f	pN_26S	f	r	120	pN_26S r
pXb_101	f	r	121	pXb_101 f	pN_26S	f	r	121	pN_26S r
pXb_101	f	r	122	pXb_101 f	pN_26S	f	r	122	pN_26S r
pXb_101	f	r	123	pXb_101 f	pN_26S	f	r	123	pN_26S r
pXb_101	f	r	124	pXb_101 f	pN_26S	f	r	124	pN_26S r
pXb_101	f	r	125	pXb_101 f	pN_26S	f	r	125	pN_26S r
pXb_101	f	r	126	pXb_101 f	pN_26S	f	r	126	pN_26S r
pXb_101	f	r	127	pXb_101 f	pN_26S	f	r	127	pN_26S r
pXb_101	f	r	128	pXb_101 f	pN_26S	f	r	128	pN_26S r
pXb_101	f	r	129	pXb_101 f	pN_26S	f	r	129	pN_26S r
pXb_101	f	r	130	pXb_101 f	pN_26S	f	r	130	pN_26S r
pXb_101	f	r	131	pXb_101 f	pN_26S	f	r	131	pN_26S r
pXb_101	f	r	132	pXb_101 f	pN_26S	f	r	132	pN_26S r
pXb_101	f	r	133	pXb_101 f	pN_26S	f	r	133	pN_26S r
pXb_101	f	r	134	pXb_101 f	pN_26S	f	r	134	pN_26S r
pXb_101	f	r	136	pXb_101 f	pN_26S	f	r	136	pN_26S r
pXb_101	f	r	137	pXb_101 f	pN_26S	f	r	137	pN_26S r
pXb_101	f	r	138	pXb_101 f	pN_26S	f	r	138	pN_26S r
pXb_101	f	r	143	pXb_101 f	pN_26S	f	r	143	pN_26S r
pXb_101	f	r	145	pXb_101 f	pN_26S	f	r	145	pN_26S r
pXb_101	f	r	146	pXb_101 f	pN_26S	f	r	146	pN_26S r
pXb_101	f	r	147	pXb_101 f	pN_26S	f	r	147	pN_26S r
pXb_101	f	r	148	pXb_101 f	pN_26S	f	r	148	pN_26S r
pXb_101	f	r	149	pXb_101 f	pN_26S	f	r	149	pN_26S r
pXb_101	f	r	152	pXb_101 f	pN_26S	f	r	152	pN_26S r
pXb_101	f	r	153	pXb_101 f	pN_26S	f	r	153	pN_26S r
pXb_101	f	r	154	pXb_101 f	pN_26S	f	r	154	pN_26S r
pXb_101	f	r	158	pXb_101 f	pN_26S	f	r	158	pN_26S r
pXb_101	f	r	160	pXb_101 f	pN_26S	f	r	160	pN_26S r
pXb_101	f	r	161	pXb_101 f	pN_26S	f	r	161	pN_26S r
pXb_101	f	r	162	pXb_101 f	pN_26S	f	r	162	pN_26S r
pXb_101	f	r	163	pXb_101 f	pN_26S	f	r	163	pN_26S r
pXb_101	f	r	164	pXb_101 f	pN_26S	f	r	164	pN_26S r
pXb_101	f	r	165	pXb_101 f	pN_26S	f	r	165	pN_26S r
pXb_101	f	r	166	pXb_101 f	pN_26S	f	r	166	pN_26S r
pXb_101	f	r	167	pXb_101 f	pN_26S	f	r	167	pN_26S r
pXb_101	f	r	-Filter	pXb_101 f	pN_26S	f	r	-Filter	pN_26S r

## Anhang J: Temperaturlogger (EasyLogGraph) Auswertung zu den Biotests

### Biotest Stufe 1



### Biotest Stufe 2:





## Anhang K: R Script

```
#####Biotest 1#####
```

```
### Daten
```

```
Biotest1 <- read.csv2("R Biotest 1 (copy2).csv", header=TRUE ,na="NA")
```

```
Biotest1
```

```
### Tabellenumwandlung
```

```
labels = colnames(Biotest1)
```

```
labels = labels[2:22]
```

```
library(tidyr)
```

```
library(reshape2)
```

```
data_long = melt(Biotest1, id.vars = "Nematoden")
```

```
head(data_long)
```

```
tail(data_long)
```

```
data_long$variable <- as.numeric(substr(as.character(data_long$variable), 2, 10))
```

```
### Darstellung Barchart
```

```
library(ggplot2)
```

```
ggplot(data=data_long) +
```

```
  geom_segment(aes(y=variable,    yend=variable-1,    x=Nematoden,    xend=Nematoden,  
color=value, size=0)) +
```

```
  scale_color_grey() +
```

```
  scale_x_discrete(expand = c(0, 0.5)) +
```

```
  scale_y_continuous(limits=c(0,max(data_long$variable)+1)) +
```

```
  ggtitle("Biotest 1") +
```

```
  coord_flip() + theme_bw() +
```

```
  guides(size = FALSE) +
```

```
  ylab("Tage")
```

```
#####Biotest 2#####
```

```
###Daten
```

```
library(ggplot2)
```

```
d <- read.csv("Biotest2.csv",header=TRUE, sep=";",row.names=NULL, as.is = TRUE)
```

```
head(d)
```

```
### Darstellung Barchart
```

```
library(tidyr)
```

```
ggplot(data=d, aes(x=Nematode, y=AnzLarven , fill=Status)) +
```

```
  geom_bar(stat = "identity") +
```

```
  scale_fill_grey() +
```

```
  ggtitle("Biotest 2") + theme(plot.title=element_text(face="bold", hjust = 0.5))
```

## Anhang L: Rohdaten Biotests

### Biotest 1

Nematoden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Kontrolle1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrolle2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrolle3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrolle4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrolle5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrolle6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3
Keine Nemat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cruzema sp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Keine Nemat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.3	33.3	66.6	66.6	66.6	66.6	66.6	66.6
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhabditis terr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diplogasteroi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.3	33.3	33.3	33.3
Keine Nemat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oscheius tipu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diplogasteroi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Keine Nemat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3
Rhabditis terr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oscheius sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Keine Nemat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oscheius sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oscheius sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.3	33.3	33.3
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Steinernema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### Biotest 2

Nematode	Status	AnzLarven
Kontrolle	Lebend	8
Keine Nemat	Lebend	3
Steinernema	Lebend	2
Oscheius sp.	Lebend	5
Steinernema	Lebend	5
Keine Nemat	Lebend	3
Steinernema	Lebend	4
Kontrolle	Tot	2
Keine Nemat	Tot	0
Steinernema	Tot	3
Oscheius sp.	Tot	0
Steinernema	Tot	0
Keine Nemat	Tot	0
Steinernema	Tot	0
Kontrolle	NichtAuffindb	2
Keine Nemat	NichtAuffindb	2
Steinernema	NichtAuffindb	0
Oscheius sp.	NichtAuffindb	0
Steinernema	NichtAuffindb	0
Keine Nemat	NichtAuffindb	2
Steinernema	NichtAuffindb	1

**Anhang M: Erklärung betreffend das selbstständige Verfassen einer Masterarbeit  
im Departement Life Sciences und Facility Management**

Mit der Abgabe dieser Masterarbeit versichert der/die Studierende, dass er/sie die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst hat.

Der/die unterzeichnende Studierende erklärt, dass alle verwendeten Quellen (auch Internetseiten) im Text oder Anhang korrekt ausgewiesen sind, d.h. dass die Masterarbeit keine Plagiate enthält, also keine Teile, die teilweise oder vollständig aus einem fremden Text oder einer fremden Arbeit unter Vorgabe der eigenen Urheberschaft bzw. ohne Quellenangabe übernommen worden sind.

Bei Verfehlungen aller Art treten Paragraph 39 und Paragraph 40 der Rahmenprüfungsordnung für die Bachelor- und Masterstudiengänge an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften vom 29. Januar 2008 sowie die Bestimmungen der Disziplinar massnahmen der Hochschulordnung in Kraft.

Ort, Datum:

Unterschrift:

Wädenswil, 22. Juli 2020

  
.....